



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

어미 마우스의 고지방 식이 섭취가
어미의 간 증대 및 산화 스트레스와
자손의 지질 대사에 미치는 영향

Effects of maternal high fat diet on
liver enlargement and oxidative stress of dams
and lipid metabolism of offspring mice

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

김 주 영

국문 초록

어미 마우스의 고지방 식이 섭취가 어미의 간 증대 및 산화 스트레스와 자손의 지질 대사에 미치는 영향

서울대학교 대학원

식품영양학과

김주영

임신 및 수유기 모체의 영양 섭취 상태는 자손의 성장과 발달의 중요 요인으로 알려져 있다. 선행 동물 연구들에서 어미의 고지방 섭취가 자손의 비만과 인슐린 저항성, 비알코올성 지방간 (Non-alcoholic fatty liver disease) 등의 질환 발병에 영향을 주는 것으로 보고되고 있으나, 고지방 식이 제공기간, 고지방 식이의 지방 구성에 따라, 자손의 출생 체중, 간 지질, 혈중 지질 등의 지표 측정 결과가 연구마다 상이하게 보고되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 어미의 고지방 식이 섭취로 인한 어미와 자손의 생화학 지표 및 간 내 유전자 발현 변화를 측정하고, 어미와 자손의 대사 변화 간 상관관계 분석을 통해 세대간 영향을 확인하고자 하였다. 5주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 임의로 대조 식이군 (CON; 총 에너지 중 10% 지방)과 고지방 식이군 (HFD; 총 에너지 중 45% 지방)으로 나누어 임신

3주전부터 실험 식이 제공을 시작한 후, 동일한 종 및 주령의 수컷 마우스와 교배하였으며, 임신기 및 수유기동안 동일한 식이를 유지하였다. 어미와 그 수컷 자손은 수유가 끝난 직후인 생후 21일에 희생하여 분석하였다. 고지방 식이 어미군은 희생 시 체중, 지방조직 무게, 혈청 중성지방 및 총 콜레스테롤에서 대조 식이 어미군에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 간 지질의 경우 고지방 식이 어미군이 유의적으로 높은 중성지방 함량과 낮은 콜레스테롤 함량을 보였으며, 이와 관련하여 간 내 유전자 발현을 측정한 결과, 불포화 지방산 전환, 콜레스테롤 대사 관련 전사인자와 지단백질 수용체 및 스테롤 수송체 발현의 차이를 나타냈다. 특히적으로 본 연구에서는 고지방 식이군에서 대조 식이군 대비 낮은 간 무게가 관찰되었다. 임신기의 간 증대를 반영하는 간 내 총 DNA 함량과 단백질 함량을 측정한 결과, 고지방 식이를 섭취한 어미군에서 유의적으로 낮았다. 또한, 수유기동안 간 조직의 catch-up growth가 일어났는지를 확인하기 위해 세포증식 지표인 proliferating cell nuclear antigen와 세포 사멸 지표인 cleaved caspase-3의 단백질 발현 정도를 측정하였고, 군간의 유의미한 차이는 나타나지 않았다. 산화스트레스의 관점에서는, 혈청 및 간 내 2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 측정을 통해 고지방 식이군에서 지질 과산화의 유의적인 증가를 확인하였고, 항산화 효소 유전자인 heme oxygenase-1과 p40phox의 발현이 대조 식이군에 비해 유의적으로 낮아짐을 확인하였다. 자손의 분석결과, 출생 체중과 해부 시 체중 및 뇌, 간 조직 무게는 차이를 보이지 않은 반면, 고지방 식이 자손군에서 지방의 상대 무게가 유의적으로 높게 나타났다. 고지방 식이 자손군에서 높은 혈중 콜레스테롤을 보였으며, 콜레스테롤 관련 전사 인자와 생합성 관련 효소의 유전자 발현은 차이를 보이지 않은 반면, 스테롤 수송체인 ATP-binding cassette sub-family G member

8에서 유의적으로 낮은 유전자 발현량을 보였다. 어미와 자손의 결과를 종합하여 상관관계 분석을 실시한 결과, 고지방식이군의 자손에서 높게 나타난 혈중 총 콜레스테롤 수치가 어미의 상대 간 절대 무게와 음의 상관관계를 ($r=-0.782$, $P=0.013$), 어미의 간 TBARS와는 양의 상관관계 ($r=0.699$, $P=0.036$)을 나타냈다. 결론적으로, 본 연구에서는 고지방 식이를 섭취한 어미에서는 임신기 대사 요구량 충족을 위한 어미의 적절한 간 증대가 일어나지 않았으며, 증가된 간 내 산화 스트레스가 수유 직후의 자손의 혈중 콜레스테롤 상승에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

주요어: 어미의 고지방 식이, 자손, 간, 임신기 간 증대, 산화 스트레스, 콜레스테롤 대사

학번: 2014-20362

목 차

국문 초록	i
목 차	iv
표 목차	vi
그림 목차	vii
약어 목록	viii
I. 서론.....	1
1. 모체 영양 환경과 자손의 대사 조절.....	1
2. 임신기 체내 대사 변화와 간 증대	3
3. 고지방식이를 섭취한 어미의 임신 및 수유기 체내 대사 변화.....	5
4. 어미의 고지방식이에 대한 자손의 체내 대사 변화.....	8
5. 연구의 목적	11
II. 연구 방법	13
1. 실험 동물 및 식이	13
2. 혈청 분석.....	14
3. 간 내 생화학 지표 분석	14
4. 간 내 담즙 분석	15
5. H&E 염색	15
6. 단백질 추출 및 Western blot.....	15
7. 간 내 총 RNA 추출 및 real-time PCR 분석	17
8. 지질 과산화 분석.....	20
9. 통계 분석.....	20
III. 결과.....	21

1. 어미 마우스의 체중 변화와 식이 섭취량.....	21
2. 어미 마우스의 해부 시 체중 및 기관 무게.....	23
3. 어미 마우스의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석	25
4. 어미 마우스의 간 내 지질 대사 관련 유전자 발현.....	28
5. 어미 마우스의 간 세포 증식.....	30
6. 어미의 지질 과산화 및 산화스트레스와 염증	34
7. 자손의 체중 및 해부 시 조직 무게.....	37
8. 자손의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석 및 어미 지표와의 상관관계	40
9. 자손의 간 내 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현	44
10. 자손의 간 발달.....	46
11. 자손의 간 내 산화스트레스 및 염증 유전자 발현	48
IV. 고찰.....	50
V. 요약 및 결론	57
참고 문헌.....	59
Abstract.....	66

표 목차

Table 1. Quantitative real-time PCR primer sequences	19
Table 2. Body and organ weight of dams.....	25
Table 3. Serum and hepatic biochemical parameters of dams	28
Table 4. Body and organ weight of male offspring.....	40
Table 5. Serum and hepatic biochemical parameters of male offspring.....	42

그림 목차

Figure 1. The effects of maternal high fat diet on later life disease development of their offspring.....	2
Figure 2. Body weight and food intake of dams during experimental period.....	23
Figure 3. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in lipid metabolism.....	30
Figure 4. Effects of maternal high fat diet consumption on total liver DNA and protein contents of dams.....	33
Figure 5. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic proliferation and apoptosis of dams.....	34
Figure 6. Effects of maternal high fat diet consumption on oxidative stress of dams ..	36
Figure 7. Effects of maternal high fat diet consumption on inflammation of dams.....	37
Figure 8. Body weight of male offspring during experimental period.....	39
Figure 9. H&E staining of liver tissue sections of male offspring.....	43
Figure 10. Correlation between offspring serum cholesterol level and dam biochemical parameters	44
Figure 11. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in cholesterol metabolism of male offspring.....	46
Figure 12. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic cell proliferation and apoptosis of male offspring	48
Figure 13. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA expression of anti-oxidative enzyme and inflammation of male offspring	50

약어 목록

ABCA: ATP-binding cassette sub-family A member

ABCG: ATP-binding cassette, sub-family G member

ALT: Alanine transaminase

AST: Aspartate Aminotransferase

BSEP: Bile salt export pump

CD: Cluster of differentiation

CON: Control diet group

CON-O: Offspring of control diet group

CPT: Carnitine palmitoyltransferase

CYP7A1: Cytochrome P450 7A1, Cholesterol 7 alpha-hydroxylase

FASN: Fatty acid synthase

FXR: Farnesoid X receptor

HDL-C: High density lipoprotein - cholesterol

HFD: High fat diet group

HFD-O: Offspring of high fat diet group

HMGCR: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase

HO: Heme oxygenase

HSC: 70kDa heat shock cognate protein

IL: Interleukin

LDLR: Low density lipoprotein receptor

LXR: Liver X receptor

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

RPL19: Ribosomal protein L19
SCD: Stearoyl-CoA desaturase
SR: Scavenger receptor
SREBP: Sterol regulatory element-binding protein
PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
PGC: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances
TC: Total cholesterol
TG: Triacylglycerol
TNF: Tumor necrosis factor
TLR: Toll-like receptor

I. 서론

1. 모체 영양 환경과 자손의 대사 조절

생애 초기 자손의 영양 환경을 모체가 전적으로 담당하는 시기인 임신기 및 수유기의 모체 영양상태가 자손의 성장과 발달의 주요 요인으로 알려져 있다 (Skogen and Overland, 2012). 성인기 건강과 질병의 발달 기원 이론 (Developmental origins of health and disease; DOHaD)에 따르면, 성인기 질병은 민감한 발달시기인 태아시기와 출생 후의 초기 발달과정에 의해 영향을 받을 수 있다 (Godfrey and Barker, 2001). 임신기 및 수유기의 저단백, 칼로리 제한 및 고지방 식이와 같은 부적절한 영양 환경은 자손 기관의 영구적인 결함을 일으키며, 생애 초기 대사 장애 및 질환 발생뿐만 아니라, 이후 성인기의 비만, 고혈압 및 비알코올성 지방간(Non-alcoholic fatty liver disease)와 같은 대사 질환을 쉽게 유발하는 것으로 알려져 있다 (Carone et al., 2010; Elahi et al., 2009; Gluckman et al., 2008; Li et al., 2011; Waterland and Garza, 1999; Wu et al., 2004). 특히 생애 초기는 자손의 성장 및 체내 기관, 특히 생명유지에 다양한 기능을 하는 간 발달 과정에 매우 중요한 시기로 알려져 있다. 위의 내용과 관련하여 모체의 고지방 식이 섭취와 자손의 대사 변화에 대한 간략한 도식을 Figure 1에 나타내었다 (Li et al., 2011; Williams et al., 2014).

World Health Organization(WHO)에 따르면, 2008년도 전세계 20세 이상의 성인의 35%가 과체중 이며 (체지방률 ≥ 25 kg/m²), 이는 1980년대 대비 2배 가량 증가한 수치이다. 비만 발병율 (체지방률 ≥ 30 kg/m²) 역시 남성의 10%, 여성의 14%로 과거 1980년도의 각 5%, 8% 대비 큰 폭으로 상승하였다 (WHO, 2014). 일반적으로 성인기의 고지방 식이는 비만, 대사

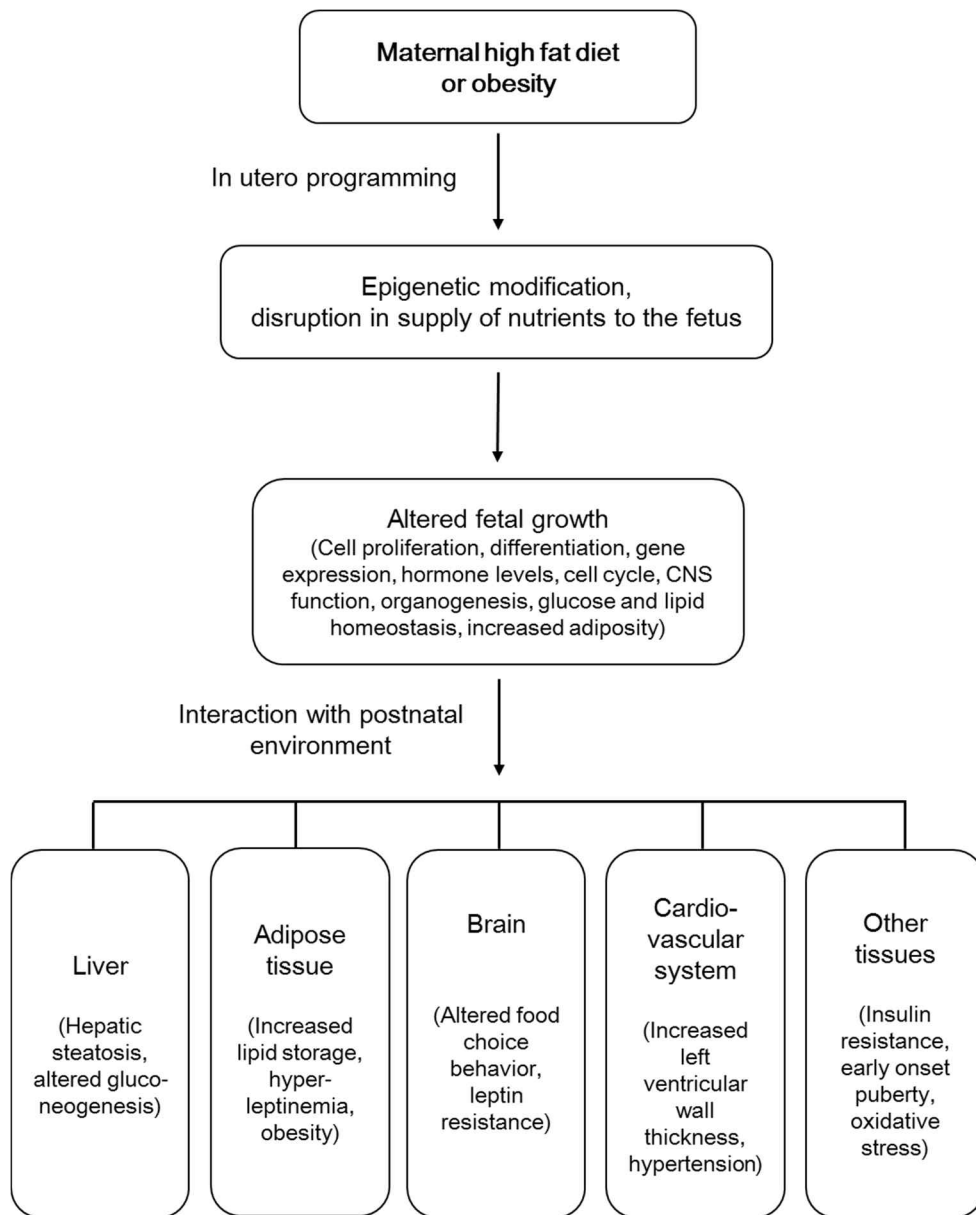


Figure 1. The effects of maternal high fat diet on later life disease development of their offspring (modified from (Li et al., 2011; Williams et al., 2014))

증후군 및 인슐린 저항증 등 성인기 질환을 유도하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 래트, 마우스 및 영장류 등 다양한 동물 실험을 통해, 자손의 생애초기 기관 발달 시기인 임신 및 수유기의 모체 식이가 자손의 생리적 기능에 미치는 영향에 대한 연구들이 다양하게 보고되고 있다. 여러 선행 연구들에서는 유전적으로 비만을 유도하거나, 약 40%–60%의 지방을 함유한 식이를 통해 고지방 식이에 따른 어미와 자손의 생리 변화를 관찰하였다. 이 식이는 WHO에서 일반적으로 사람에게 권장되는 지방 섭취량인 15%–30%를 크게 웃도는 수치로, 체내 대사를 변화시키고, 대사 질환을 유도할 것으로 생각된다 (Amine et al., 2002; Aranceta and Perez-Rodrigo, 2012).

간은 신체 내 가장 큰 기관 중 하나로, 글리코겐 전환 및 축적, 담즙 생성, 혈액 단백질 생성 및 해독작용 등 생명유지에 필요한 다양한 기능을 수행한다. 간 세포(hepatocyte)는 간 조직을 이루는 주요 세포로 배아기와 같은 생애초기에 내배엽(endoderm)으로부터 분화되어 발달하며, 이 시기에 주변 환경에 의해 매우 민감하게 발달하는 것으로 알려져 있다 (Zorn, 2008). 따라서, 고지방 식이와 같은 외부 자극으로 인해 생애 초기 간의 발달이 정상적으로 이루어지지 않게 되는 경우 대사상의 문제를 유발할 수 있다.

2. 임신기 체내 대사 변화와 간 증대

임신기 모체의 간은 태아의 성장과 태반 발달 등, 증가하는 대사 요구량을 충족시키기 위해 대사적인 변화를 수반한다 (Herrera, 2000; Zou et al., 2013). 특히 임신 중 이러한 대사 요구량을 만족시키기 위해, 모체의 간은 간세포의 크기 증가 (hypertrophy)와 그 수의 증가 (hyperplasia)를 통해 임신에 따른 대사적 적응을 한다 (Bustamante et

al., 2010; Dai et al., 2011; Zou et al., 2013). 임신기의 간은 성 호르몬인 에스트로겐과 혈청 내 담즙산 증가 등의 영향으로 그 크기가 증대되며, 세포주기 조절 인자인 p53, cyclin D1 단백질의 발현 변화 및 전사인자 Farnesoid X receptor (FXR)의 발현 감소 등을 통해 세포 상의 변화를 나타낸다 (Milona et al., 2010). 또 다른 임신기 간의 주요 특징 중 하나는, 혈청 및 간 내 콜레스테롤과 담즙 항상성의 변화이다. 태아의 간은 미성숙하여 담즙을 제거할 수 있는 능력이 없음에도 불구하고 담즙을 생성하기 때문에, 이를 제거하기 위해 태아의 담즙은 태아의 간-태반-어미 간 경로를 거쳐 모체의 간을 통해서 제거된다 (Marin et al., 2008). FXR은 담즙을 리간드로 작용하는 핵수용체로, 하위 인자인 Short heterodimer partner (SHP)의 발현을 증가시키며, 이를 통해 담즙 생성과정의 제한 효소 (rate limiting enzyme)인 Cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1)의 발현을 감소시킨다. 또한, FXR은 Bile salt export pump (BSEP)의 발현을 증가시켜, 간 내 담즙의 배출을 증가시킨다 (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000). 임신기 모체의 간에서는 태아로부터 유입된 다량의 담즙으로 인해 FXR 활성이 증가할 것으로 예상되나, 임신기 성호르몬인 에스트로겐의 증가와 에스트로겐 수용체의 증가로 인해, FXR 하위 유전자인 SHP 활성이 감소하여 마치 FXR의 활성이 감소한 듯한 procholestatic 환경을 조성한다. 이를 통해 간 내 담즙 정체성 기전이 활성화 되는 것으로 알려져 있다 (Papacleovoulou et al., 2011; Zhu et al., 2013). 임신기간 중 담즙 대사에 문제가 생길 경우 정상보다 과도한 임신기 담즙 정체성 간 질환이 유발되며, 이러한 모체 간 내 담즙의 과다 축적으로 태아에게 까지 독성 효과를 내는 것으로 알려져있다 (Williamson and Geenes, 2014). 임신기 모체 간의 정상적 발달이 저해되어 담즙산 배출능력이 손상되었다면, 자손에서 수송된 담즙이 정상적으로 배출되지

못하고, 태아의 간에 채수송 되어 그에 따른 독성 효과를 받을 것으로 생각된다.

3. 고지방식을 섭취한 어미의 임신 및 수유기 체내 대사 변화

임신 수유기의 고지방 섭취는 어미의 식이 섭취량, 체내 구성, 호르몬 및 아디포카인, 당 및 지질 대사 그리고 태반의 영양소 수용체의 변화를 수반하며, 이러한 변화들로 모체 간의 대사적 부담을 증가시킬 것으로 사료된다 (Williams et al., 2014). 최근의 선행 연구들에 따르면, 모체의 고지방 식이가 자손의 성장 및 발달에 미치는 영향 및 요인을 다양한 관점으로 보고하고 있다. 첫째로, 비만, 당뇨 및 태아발육지연 (Intrauterine growth retardation) 등 모체의 대사적 질환 및 영양상태 변화를 자손에게 영향을 미치는 중요 요인으로 보는 연구들이 있다 (Higa and Jawerbaum, 2013). 임신한 여성의 비만의 경우, 비임신 여성에 비해 더 민감하게 고인슐린혈증, 고지방혈증, 고혈압 및 염증 증가와 같은 대사 변화를 보였으며, 자손의 성인기 심혈관 질환과 상관관계가 있는 것으로 보고되었다 (Ramsay et al., 2002). 임신기 중 모체와 자손의 물질이동은 태반을 통해 이루어지며, 모체 내 영양소 농도 및 태반의 변화는 자손의 성장 및 발달에 영향을 준다 (Larque et al., 2013). 한 C57/BL6 마우스 연구에서는 임신 전 및 임신기의 고지방 식이로 인해 어미의 혈중 유리지방산 감소, 중성지방 증가와 함께 태반의 Glucose transporter 1 (GLUT1), Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2)의 단백질 발현 증가로 해당 영양소의 태반 운송량이 증가하였으며, 배아 18.5일의 자손에서 과성장이 일어남을 확인하였다 (Jones et al., 2009). 모체의 지방산은 Fatty acid transporter protein

(FATP)를 통해 태반 내로 수용되고, 태반 내에서 산화 작용, 신호 전달 및 유전체 조절과 같은 생화학적 활성을 갖거나 자손에게 전달되어 사용된다. 고지방 식이로 인해 모체 내에서 지방산의 농도가 달라지는 경우, 태반 및 영양소 농도가 변화하며, 자손의 성장 및 발달에 영향을 미칠 것으로 보고되고있다 (Cetin et al., 2012; Hernandez et al., 2012). 고지방 식이를 통한 임신기 중 영양소 변화에 대한 선행논문에서는 높은 혈중 비에스테르형 지방산, 간의 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC1), Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)의 mRNA의 증가가 관찰되었다 (Hartil et al., 2009).

둘째, 임신기 및 수유기의 모체 고지방식은 체내 호르몬의 변화를 수반한다. 비만 관련 역학 연구 및 설치류를 이용한 동물연구들에서 비만 개체들은 아디포넥틴의 감소, 렙틴의 증가 등의 변화가 관찰되며, resistin의 경우 연구간의 상이한 결과가 보고되었다 (Heerwagen et al., 2010; Mitchell et al., 2005). 아디포넥틴은 체질량 지수와 음의 상관관계를 가지며, 고지방식으로 인해 변화된 아디포넥틴은 모체의 당 신생합성 증진, 지방산 산화, 인슐린 민감도 감소, 태반에서 인슐린 신호 전달, 아미노산 수용을 변화시키며, 자손의 발달에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 특히 이 아디포넥틴은 어미와 자손을 연결하는 요인으로 연구되고 있으며, 모체의 경우 지방조직을 중심으로 연구되고 있다 (Aye et al., 2013).

셋째, 고지방 식이 섭취로 인한 모체의 산화스트레스 증가와 염증 환경 조성이 자손의 성장 및 발달에 영향을 미친다. 선행 연구들에 따르면, 고지방 식이를 섭취로 인해 모체 내에서 과도한 산화반응이 일어나며, 미토콘드리아 대사 저해와 항산화 능력 저해가 유발되고, 지방 독성을

보이는 것으로 보고되고있다 (Hughes and Oxford, 2014; Pruis et al., 2014; Segovia et al., 2014). 또한 모체에서는 Tumor necrosis factor α (TNF α), Interleukin-6 (IL-6), c-reactive protein 증가와 같은 pro-inflammatory 환경을 조성하는 것으로 알려져있다. 모체에서 변화된 사이토카인의 농도와 더불어 비만한 모체의 태반에서는 염증 지표인 Cluster of differentiation 14 (CD14)의 수치 상승과 지방산 증가로 인한 Toll-like receptor 4 (TLR4)의 증가로 대식세포의 침투 증가와 같은 염증반응이 크게 나타난다. 이를 통해 자손에게서 pro-inflammatory 유전자의 발현 증가, 항산화 효소 및 미토콘드리아 대사 관련 유전자의 감소, Insulin receptor substrate (IRS1)-serine 인산화를 통한 인슐린 신호 전달 저해 및 간 독성 등 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Challier et al., 2008; Higa and Jawerbaum, 2013; Zhu et al., 2010). 또한 모체의 고지방 식이가 어미에서 높은 혈중 IL-1 β , TNF α (Ashino et al., 2012), 간 내 염증 지표의 증가와 지질 축적 및 지질 대사의 변화가 보고되었으며, 이 같은 변화가 태어난 직후 자손의 염증에 영향을 줄을 확인하였다 (Li et al., 2013).

마지막으로 최근의 연구들에서는 고지방 식이로 인한 후생적 효과가 보고되고 있다. 래트의 지방조직에서 어미의 고지방 식이로 인한 식욕조절 호르몬인 렙틴 프로모터의 메틸화 패턴변화 (Milagro et al., 2009)와 마우스 난모 세포에서 PPAR α 프로모터의 DNA 메틸화에 관련된 연구 등이 보고되고 있으며, 이로 인한 자손의 간 내 DNA 메틸화 변화에 초점을 함께 두어 모체의 영양학적 연구와 유전적 변화를 통합하는 연구들이 활발히 이루어지고 있다 (Ge et al., 2014).

수유기의 모체의 체내 대사 변화 및 영양환경 변화 역시 자손의 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 수유기가 끝나는 시기까지 자손은

전적으로 모유를 통해 영양소를 섭취하므로, 이 시기 역시 임신기와 더불어 생애초기 자손의 성장 및 발달에 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다. 수유기 선행연구들에서는 고지방 식이로 인해 어미 마우스 유선의 지방합성이 감소되고, 중성지방, 지방산 및 에너지 함량 감소 등의 변화를 보고하거나(Aoki et al., 1999), 고지방 식이로 인해 모유내 지방산의 포화 비율 및 탄소수 증가, 모유당 지질 함유량 증가로 자손의 피부에서 TLR2/4-의존적 독성을 보고하였다 (Du et al., 2012). 모유 생성을 확인한 연구에서는 고지방 식이의 어미마우스에서 GLUT1, α -lactalbumin, β -casein의 mRNA 발현 감소 및 염증관련 유전자인 IL-6, TNF α 증가를 보고하였다 (Hernandez et al., 2012). 또한, 모유의 성분변화에 대한 연구에서는 생후 11, 21일의 모유 성분 분석을 통해 어미 래트(rat)의 고지방 섭취에 따른 단백질, 락토오스, 중성지방, 총 콜레스테롤의 증가를 확인하였다 (Franco et al., 2012). 이처럼 임신 및 수유기의 고지방 식이는 모체의 생화학적, 유전적 변화를 일으켜 자손의 성장 및 발달에 영향을 주며, 이에 대한 다양한 원인에 대한 연구들이 이루어지고 있다.

4. 어미의 고지방식이에 대한 자손의 체내 대사 변화

자손의 간은 태중 및 수유기와 같은 특정 시기에 빠른 발달이 일어나며, 수유기 전후로 발달 및 성장이 완료된다. 이러한 생애 초기의 간 발달은 영양상태에 따라 큰 영향을 받으며, 이 영향으로 변화된 간 발달 상태 및 기능적인 대사 변화가 이후 성인기 자손의 대사 및 질환 발병에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Waterland and Garza, 1999). 마우스의 경우 3주간의 임신기간 중 배아 9일 (embryonic day 9) 시기에 간의 개체 발생이 시작 되며, 약 배아 10.5일 에서 12.5일 정도에 주요 조혈 형성 기능이 완료되고, 배아 14.5일 정도 간 세포와 담즙 관의 세포 형성이

일어난다. 이 시기를 거치며 자손의 간은 점차 주요한 대사기능을 수행하는 성숙한 간으로 발달하는데, 이 발달 과정 중 어미의 고지방 식이와 같은 환경적 자극으로 발달이 지연되거나 부적절하게 이루어지는 경우 성인기 대사 질환에 노출되기 쉬울 것으로 보고된다 (Hata et al., 2007; Li et al., 2009; Peng et al., 2012; Renaud et al., 2014).

모체 고지방식으로 인한 자손의 대사 변화에 관한 선행논문들은 다양한 시기와 관점으로 자손의 대사 변화를 설명하고 있다. 임신기 및 수유기동안 고지방식을 섭취한 래트에서는 생후 2일인 자손의 간에서 세포 주기 저해인자인 Cdk1a의 증가로 인한 G0/G1기 세포 주기 정지 비율의 증가를 확인하였고, 수유 종료 후인 생후 27일에서는 이 같은 세포 주기 저해 요소가 나타나지 않음을 확인하였다 (Dudley et al., 2011). β -catenin은 세포막에 E-cadherin과 복합체를 이루어 존재하며 세포 증식, 분화 및 배아기 간 발달 등 세포의 분열시기에 활성화 되는 것으로 알려져 있다 (Apte et al., 2007). 초기 간 발달에 중요한 역할을 하는 이 Wnt/ β -catenin 신호 경로에 대한 한 선행연구에서는, 수유기 중간 시기인 생후 7일의 자손에서 고지방 식이 자손군이 유의적으로 β -catenin의 단백질 발현 양이 낮음을 보여 간발달이 저해되었음을 확인하였고, 이것을 Wnt1의 histone modification에 의해 나타난 간 발달 저해로 설명하였다 (Yang et al., 2012). 어미의 과체중 유도 후의 임신 연구에서는 수유 종료 직후 시점인 생후 21일에서 과체중 자손군의 인슐린 및 아디포넥틴 신호 전달 변화와 지질 대사 변화를 통해 자손의 에너지 균형 조절에 영향을 미친 것을 관찰하였다. 이 연구에서는 식이의 기간이나 조성보다 어미의 과체중 표현형 자체가 자손에게 미치는 영향을 규명하는데 초점을 두었다 (Gaccioli et al., 2013). 그 밖의 연구에서는 어미 고지방 식이 섭취군 생후 1일, 10일 자손에서 모두 산화스트레스 증가와 간 지방증을 확인하였고

(Bringhenti et al., 2015), 생후 14일의 자손에서 어미의 고지방식이에 의한 성별간 콜레스테롤 대사 이상을 확인하고 그 기전을 밝혔다 (Mischke et al., 2013). 생후 21일 자손의 연구에서는 어미의 고지방식으로 인해 자손의 간 내 PPAR mRNA발현 변화와 간 내 당, 지질 대사 변화를 관찰하였으며, 고지방 식이 자손군에서 출생 직후 낮은 체중과 수유 종료 직후 높은 체중으로 역전된 결과를 통해 고지방 식이 자손군의 회복 성장(catch-up growth)의 가능성을 제시하였다 (Zheng et al., 2014).

고지방 식이를 섭취한 자손의 성인기 질환 발병에 관한 연구는 수유 후 식이 조성과 기간에 따라 더욱 다양하게 이루어지고 있다. 어미 쥐의 비만에 관한 한 마우스 연구에서는 고지방 식이를 섭취한 어미군의 8주령 자손 마우스에서 산화스트레스 증가와 지질 대사의 변화 및 미토콘드리아 대사 기능의 문제로 인한 지방간 발병을 보고하였다 (Alfaradhi et al., 2014). 미토콘드리아는 모계 유전되므로, 어미 난포에서 PGC1 α 의 변화와 같은 미토콘드리아 대사 및 활성 산소 중 증가의 문제가 나타날 경우, 자손에게 직접적인 영향을 줄 것으로 생각된다. 자손의 성인기 비알코올성 지방간염 (Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH) 유발을 확인한 논문에서는 고지방 식이 어미 군의 자손이 수유 후 지속적으로 고지방식이를 섭취하였을 때, 어미가 임신 및 수유기에 혹은 자손이 수유기 이후에서만 고지방 섭취를 한 군에 비하여 NASH의 유발이 유의적으로 많이 나타났고, 이를 간 내 미토콘드리아 대사 이상과 간 내 지질 축적 관련 유전자의 증가에 의한 영향으로 설명하였다 (Bruce et al., 2009). 이처럼 어미의 고지방식이의 영향을 받은 자손에 관한 연구들은 자손을 다양한 시기, 기관, 원인으로 분석하고 있으며, 이에 대한 다양한 해석들을 보고하고있다. 그러나 선행연구들에서는 동일한 어미의 고지방 식이 연구임에도 불구하고, 연구 간의 상이한 결과들로 고지방 식이에 의한

영향을 명확히 규정짓는데 어려움이 있다. 측정 지표 중 출생 직후 체중의 경우, 군간의 유의적인 차이를 나타내지 않거나 (Brighenti et al., 2015; Li et al., 2012; Tamashiro et al., 2009; Yang et al., 2012), 고지방 식이 섭취 자손에서 더 낮은 출생 체중 (Zheng et al., 2014) 혹은 반대로 높은 출생 체중을 보고한 연구와 같이 (Mischke et al., 2013) 일관되지 못한 결과들을 보고하고 있다. 자손의 혈중 지질 농도 역시, 중성지방과 콜레스테롤이 고지방 식이 자손군에서 높은 경우와 (Mischke et al., 2013), 군간의 차이가 나타나지 않거나 (Yang et al., 2012) 혹은 콜레스테롤에서만 고지방 식이군이 높게 나타나는 등 (Zheng et al., 2014), 희생 시기와 어미 식이의 지방 함유량에 따라 상이한 결과들을 보이고 있다. 고지방 식이를 섭취한 어미의 연구에도 역시 희생시 체중에서 유의적인 차이가 있거나 (Cannon et al., 2014) 혹은 동일한 경우 (Shankar et al., 2010), 간 조직 상대 무게가 비만 어미군의 무게가 더 나가거나 (Shankar et al., 2010), 혹은 그 반대의 경우 (Mischke et al., 2013)로 나타나는 등 연구간 상이한 결과를 나타낸다는 한계점이 있다.

5. 연구의 목적

모체의 식이 구성과 섭취는 자손의 성장 및 다양한 조직의 기능적 발달에 장기적 영향을 미치며, 자손의 항상성 조절 메커니즘 관련 유전자의 발현까지 영향을 줄 것으로 생각되고 있다 (Cannon et al., 2014; Williams et al., 2014). 근래의 여러 선행논문들에서 어미의 과영양상태와 자손의 당 대사 및 지질 대사 이상, 비만 등 대사 질환에 영향을 주는 것으로 보이고 있으나, 각 연구에서 식이 섭취기간과 식이 내 지방 함유량에 따라 상이한 연구 결과를 나타낸다는 한계점을 나타내고 있다 (Cianfarani et al., 2012; Heerwagen et al., 2010). 또한, 선행 연구에서 고지방 식이 섭취로 변하는

것으로 알려진 어미의 지질 대사, 세포 주기 및 증식, 산화 스트레스, 염증 대사와 자손과의 상관관계에 대한 이해 역시 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 어미의 고지방 식이 섭취로 인한 어미와 자손의 생화학적 지표 및 간 내 유전자 변화를 지질 대사, 세포 주기 및 증식, 산화 스트레스, 염증 대사 중심으로 분석하고, 어미와 자손의 대사 변화간 상관관계 분석을 통해 세대간 영향을 확인하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 실험 동물 및 식이

오리엔트바이오 사(대한민국)에서 구매한 약 14 g의 4주령의 암컷 C57Bl/6 마우스를 실험 군 당 4마리씩 4개 케이지로 분리해 사육하였다. 동물 사육은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암 주기(7:00 AM-7:00PM)의 환경에서 진행되었다. 모든 동물은 식이와 물을 자유 급여법으로 제공받았으며, 1주간 일반 사료 (normal chow diet)로 적응기간을 가졌다. 적응기간 후 5주령의 암컷 마우스는 임의로 대조 식이군 (Control diet group, CON)과 고지방 식이군 (High fat diet group, HFD)의 2개 군으로 나누어 각각 대조 식이(#D12450B, Research diets Inc., 총 에너지 중 10% 지방, 20% 단백질, 70% 탄수화물; 총 에너지 3.85 kcal/g) 혹은 고지방 식이 (#D12451, Research diets Inc., 총 에너지 중 45% 지방, 20% 단백질, 35% 탄수화물; 총 에너지 4.73 kcal/g)를 제공받았다. 3주간의 식이 섭취 후, 각 2마리 암컷 마우스는 8주령의 수컷 마우스와 한 케이지에서 5일간 교배를 실시하였다. 임신한 마우스들은 교배 실시 16일 후, 개별 케이지로 옮겨 사육되었으며, 출산 후 3일에 자손수로 인해 발생하는 오차를 방지하기 위해 모든 어미당 자손수를 6마리로 조정하였다. 모든 어미의 식이는 임신 전, 임신기, 수유기 모두 동일하게 유지되었으며, 실험기간동안 어미의 식이 섭취량은 일주일에 3회 측정하였고, 어미와 자손의 체중은 주 1회 측정하였다. 모든 어미와 수컷 자손은 자손의 수유기가 끝나는 생후 21일에 희생하였다.

희생 시점에서 모든 마우스는 14시간 금식 후, 30 mg/kg 졸레틸 50 (Virbac, 프랑스)과 10 mg/kg xylazine (럼폰; 바이엘 코리아, 대한민국) 혼합액을 복강 투여하여 마취하였다. 혈액은 심장채혈을 통해 수집하였고,

20분간, 3000 rpm, 4℃에서 원심분리를 통해 상층액을 분리하여 혈청을 얻었으며, 실험 시까지 -80℃에 보관하였다. 모든 조직은 적출 후 phosphate-buffered saline (PBS)에 세척하여 무게를 측정하였고, 액체 질소로 즉각 동결 후 -80℃ 냉동 보관하였다. 간 조직 일부는 10% neutral buffered formalin에서 고정하여 간 조직 염색에 이용하였다.

연구에 사용된 모든 동물 실험은 서울대학교 동물실험윤리 위원회 규정에 따라 진행되었다. (승인번호: SNU-140807-1-3)

2. 혈청 분석

혈당, 중성지방, 총 콜레스테롤, 고밀도 지질단백질 콜레스테롤(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C), Alanine transaminase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST)은 각각 효소법을 이용한 분석 시약(아산 제약, 대한민국)을 사용하여 측정하였다. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)은 Quantikine® 마우스 MCP-1 면역 분석 시약(R&D Systems, 미국)을 사용하여 sandwich enzyme linked immunosorbent assays (sandwich ELISA) 방법으로 측정하였다. 모든 흡광도는 분광 광도계 (SpectraMax® 190, molecular Devices, 미국)를 이용하여 측정하였다.

3. 간 내 생화학 지표 분석

간 내 지질은 Folch 등 (Folch et al., 1957)의 방법에 따라 측정하였다. 약 25 mg 의 간 조직을 500 µL PBS에 담가 조직 분쇄기 (Tissue Lyser system, Qiagen, 미국)와 5 mm sterile stainless steel beads를 이용하여 균질화 하였다. 모든 균질화 용액 내 단백질을 Brad-ford 단백질 분석

시약 (Bio-Rad, 미국)을 이용해 측정 한 후, 0.3 mg/300 μ L로 농도를 조정하여 800 μ L의 chloroform과 400 μ L의 methanol (2:1, v:v)을 넣고, 16시간동안 4℃에서 반응시켰다. 그 후 240 μ L의 0.88% KCl을 넣어 15분간, 1,000 \times g, 4℃에서 원심분리를 한 후, chloroform 하층액을 새 튜브에 옮겼다. 튜브 내의 용매를 모두 건조시킨 후, 건조된 지질을 완충용액 (중성지방; N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-amioethane sulfonic acid, 콜레스테롤; Phenol)을 이용해 녹인 후, 각각 혈청 분석에서 사용한 중성지방과 총 콜레스테롤 분석 시약을 사용해 흡광도를 측정하였다. 간 내 총 DNA 는 DNeasy 혈액 & 조직 분석 시약 (Qiagen, 미국)를 이용하여 측정하였다.

4. 간 내 담즙 분석

간 내 담즙 추출을 위해서 간 조직을 75% ethanol에 조직 분쇄기를 사용하여 균질화 하였고, 50℃에서 2시간동안 가온하여, 10,000 rpm, 10분, 4℃에서 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 새 튜브에 옮긴 후, 총 담즙 분석 시약 (Bioquant, 미국)을 이용하여 측정하였다.

5. H&E 염색

Formalin에 고정된 간을 파라핀 블록으로 만들어 5-10 mm 절편으로 자르고 파라핀을 제거하였다. 이 샘플을 슬라이드에 부착한 후, 간 내 지방구 확인을 위한 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였다.

6. 단백질 추출 및 Western blot

약 25 mg의 간 조직에 500 μ L의 단백질 용해 용액 [Protein lysis buffer;

50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 2.5 mM EGTA (pH 8.0), 1 mM NaF, 10 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, 1% NP-40, 10% glycerol, Protease inhibitor cocktail (Sigma, 미국)]을 넣어 조직 분쇄기를 이용하여 균질화하였다. 균질화 된 용액은 30분간, $10,000 \times g$, 4°C에서 원심분리하여, 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 보관하였다. 각 샘플의 단백질 농도는 Brad-ford 단백질 분석 시약 (Bio-Rad, 미국)을 이용하여 측정하였다.

각 30 μg 의 단백질 샘플들을 polyacrylamide gel에서 전기영동을 통해 분자량에 따라 분리하여, semi-dry electro-transferring unit (Bio-Rad, 미국)을 이용하여 15 V에서 60분간 Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 이동시킨 후 Western blot에 사용하였다. TTBS (Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween-20, pH7.5) 에 5% 탈지분유를 첨가한 용액으로 PVDF membrane을 blocking 후, 측정하고자 하는 1차 항체를 TTBS에 5% 탈지분유를 첨가한 용액에 특정 배수로 희석하여 반응시켰다. 1차 항체 제거 후 TTBS 용액으로 10분간 세 번씩 세척 후, 2차 항체 (anti-mouse or anti-rabbit IgG-peroxidase-conjugated secondary antibody)로 반응시켰다. 항체가 결합된 단백질은 화학 발광법 (chemiluminescent)을 이용하여 horseradish peroxidase substrate (Millipore, 미국)로 발광시킨 후, X-ray 필름 (FUJI, 일본)에 노출해 그 밴드를 얻었다. 각 밴드의 두께는 Quantity One 프로그램 (Bio-Rad)을 통해 정량 하였다. 실험에 사용된 1차 항체는 다음과 같다: anti- 70kDa heat shock cognate protein (Hsc70; #sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, 미국), proliferating cell nuclear antigen (PCNA, #sc-56, Santa Cruz Biotechnology), β -catenin (#sc-7199, Santa Cruz Biotechnology), cleaved caspase-3 (#9664, Cell signaling, 미국).

모든 실험에서 각 단백질 양을 보정하기 위해 HSC70이 사용되었다.

7. 간 내 총 RNA 추출 및 real-time PCR 분석

간 내 RNA는 RNAiso Plus (Takara Bio Inc., 일본)와 조직 분쇄기 (Qiagen, 미국), 5 mm sterile stainless steel beads를 이용해 균질화 하였다. 균질화 용액을 상온에 5분 방치 후, 100 μ L의 chloroform을 넣은 후 흔들어 상온에 3분간 다시 방치하였다. 15분간, 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 상층액을 분리하고, isopropanol을 첨가하여 상온 10분 방치 후, 다시 10분간, 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 500 μ L의 75% ethanol을 넣어 15분간, 7,500 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리 하여 정제된 RNA 침전물을 얻었다. 이를 diethylpyrocarbonate (DEPC) water에 녹인 후 농도와 260/280nm 흡광도 비율로 순도를 측정하였다.

cDNA는 Superscript[®] II 역전사 효소 (Invitrogen, 미국)와 2 μ g의 RNA를 사용하여 제조하였다. StepOne[™] Real Time PCR 기기 (Applied Biosystems, 미국)를 이용하여, 정량적 real-time PCR을 통해 간 내 cDNA 발현 수준을 측정하였다. 실험은 SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystem, 미국) 시약을 사용하여, 30초동안 95 $^{\circ}$ C 변성 전 과정 (predenaturation), 15초 간 95 $^{\circ}$ C에서 변성(denaturation), 1분간 60 $^{\circ}$ C에서 프라이머와 결합 (annealing) 그리고 증폭 (extension) 과정을 40회 반복하였다. 상대적 발현량은 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법을 이용하여 계산하였으며 연구에 사용된 프라이머의 서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Quantitative real-time PCR primer sequences

Gene	Forward (5'-3')	Reverse(5'-3')
ABCA1	CCCAGAGCAAAAAGCGACTC	GGTCATCATCACTTTGGTCCTTG
ABCG5	AATGCTGTGAATCTGTTTCCCA	CCACTTATGATACAGGCCATCCT
ABCG8	TCCATCCTCGGAGACACGAT	GCTGATGCCGATGACAATGA
CD36	TCCTCTGACATTTGCAGGTCTATC	AAAGGCATTGGCTGGAAGAA
CD68	GCACAGCCAGCCCTACGA	GAGCTGGTGTGAACTGTGACATT
CPT1a	ACGGAGTCCTGCAACTTTGT	GTACAGGTGCTGGTGCTTTTC
CYP7A1	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	GTCCGGATATTCAAGGATGCA
FASN	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT	GGGTAATCCATAGAGCCCAG
FXR	TCCGGACATTCAACCATCAC	TCACTGCACATCCCAGATCTC
HMGCR	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
HO-1	CCTCACTGGCAGGAAATCATC	CCTCGTGGAGACGCTTTACATA
LDLR	TGGCCATCTATGAGGACAAA	GTGTGACCTTGTGGAACAGG
LXR α	AGGAGTGTCGACTTCGCAAA	CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT
MCP-1	CCAGCACCAGCACCAGCCAA	TGGGGCGTTAACTGCATCTGGC
SCD1	ATCTCCAGTTCTTACACGACCACC	CGTCTTCACCTTCTCTCGTTCATT
SR-A	TTGCTCTCTACCTCCTTGTGTTTG	CCATAGGACCTTGAGATGTGTCACT
SR-B1	CCTTCAATGACAACGACACCG	CCATGCGACTTGTGAGGCT
SREBP-2	GCGTTCTGGAGACCATGGA	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA
PPAR α	CCTCAGGGTACCACTACGGAGT	GCCGAATAGTTCGCCGAA

PPAR γ	TGCACTGCCTATGAGCACTT	TGATGTCAAAGGAATGCGAG
p40phox	CCTGCCCACATTGCCAGCCA	AGACCGGCAGGCTCAGGAGG
TNF α	GGCTACAGGCTTGCTACTCGA	CACGCTCTTCTGTCTACTGAA
RPL19	TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC	ATCAGCCCATCCTTGATCAGC

ATP-binding cassette sub-family A member 1 (ABCA1), ATP-binding cassette sub-family G member 5 (ABCG5), ATP-binding cassette sub-family G member 8 (ABCG8), cluster of differentiation 36 (CD36), cluster of differentiation 68 (CD68), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1a), cytochrome P450 7A1 (CYP7A1), fatty acid synthase (FASN), farnesoid X receptor (FXR), 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR), heme oxygenase 1 (HO-1), low density lipoprotein receptor (LDLR), liver X receptor α (LXR α), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), scavenger receptor A (SR-A), scavenger receptor B1 (SR-B1), sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), tumor necrosis factor α (TNF α), ribosomal protein L19 (RPL19)

8. 지질 과산화 분석

간 지질 과산화 정도를 측정하기 위해 TBARS를 Ohkawa 등 (Ohkawa et al., 1979)의 방법으로 측정하였다. 25 mg의 간 조직에 500 μ L의 균질 완충용액 [Homogenizing buffer; 154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 7.4)]을 넣어 조직 분쇄기를 이용하여 균질화한 후, 10분간, 600 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 상층액만 새 튜브에 분리하였다. 상층액에 8.1% SDS, 10 % acetic acid, 0.8% thiobarbituric acid (TBA)를 첨가한 후 이를 95 $^{\circ}$ C에서 가온하여 반응을 진행하였고, 1시간 후 반응을 종료하기 위해 빠르게 얼음 위에서 식혔다. 1-butanol:pyridine 혼합액 (15:1, v/v)을 샘플에 첨가하여 강하게 섞어준 후 20분간, 4000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 붉은 상층액을 얻었고, 532 nm에서 흡광 광도계 (SpectraMax[®] 190, molecular Devices, 미국)로 흡광도를 측정하였다. TBARS 농도는 1,1,3,3-tetraethoxypropane 용액을 표준용액으로 사용하여 계산하였으며, 단위는 malondialdehyde/mg protein 양으로 표기하였다. 혈청 TBARS의 경우 간 TBARS에서 상층액을 얻은 후 과정과 동일하게 진행하였다.

9. 통계 분석

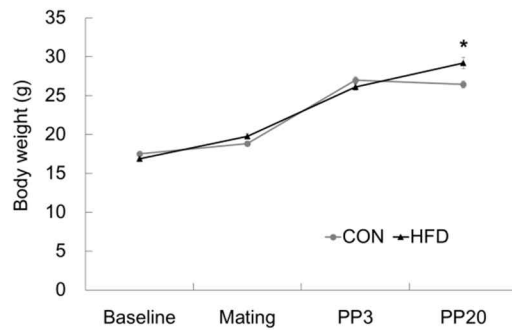
모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)으로 나타냈으며, 군간 비교분석은 t-test를 통해, 유의수준 $P < 0.05$ 에서 검증하였다. 두 변수간의 상관관계는 피어슨 상관계수 (Pearson correlation coefficient)로 나타내었다. 분석은 SPSS ver.22 (IBM SPSS, 미국)을 통해 실시하였다.

Ⅲ. 결과

1. 어미 마우스의 체중 변화와 식이 섭취량

실험기간동안 어미 마우스의 체중 변화는 다음과 같다. 실험식이 시작 시, 수컷과 교배 시, 출산 후 3 일에는 군간의 유의적인 체중 차이가 나타나지 않았고, 실험 종료 시인 출산 후 20 일의 금식 전 체중에서 유의적으로 고지방 식이 어미군이 대조 식이 어미군에 비해 높은 체중을 보였다 (Figure 2 (A)). 식이 섭취량은 임신 준비기, 임신기, 수유기로 나뉘며, 개체당 하루 식이 섭취량을 gram 과 kcal 로 표시하였다. 임신기와 수유기동안의 식이 섭취량의 gram 수는 고지방 식이 어미군에서 유의적으로 낮았으나, 임신 준비기, 임신기, 수유기동안 식이로 섭취한 총 에너지량은 고지방 식이 어미군에서 모두 유의적으로 높았다 (Figure 2 (B)).

(A)



(B)

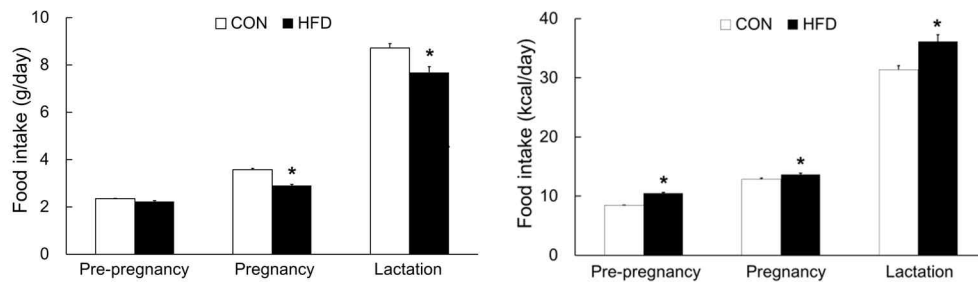


Figure 2. Body weight and food intake of dams during experimental period

(A) Body weight of dams at baseline, mating, after delivery (PP3) and weaning (PP20) and (B) food intake (gram/day or kcal/day) of dams during pre-pregnancy, pregnancy and lactation. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

PP; Postpartum day, CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

2. 어미 마우스의 해부 시 체중 및 기관 무게

어미 마우스의 해부 시 체중과 지방조직의 절대 무게 및 체중 상대 무게가 고지방 식이 어미군에서 대조 식이 어미군에 비해 유의적으로 높았다. 본 실험에서는 기관의 무게 중 특이적으로, 대조 식이 어미군의 간 무게 및 체중 상대 무게가 고지방 식이 어미군보다 유의적으로 높게 나타났다 (Table 2).

Table 2. Body and organ weight of dams

Group	CON (n = 7)	HFD (n = 5)
Final body weight (g)	23.09 ± 0.44	26.32 ± 0.62 *
Organ weight (g)		
Liver	1.73 ± 0.04	1.29 ± 0.05 *
Adipose tissue‡	0.15 ± 0.02	0.39 ± 0.04 *
Relative organ weight (% of body weight)		
Liver	7.48 ± 0.16	4.90 ± 0.08 *
Adipose tissue‡	0.65 ± 0.07	1.48 ± 0.14 *

Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

‡The sum of retroperitoneal and perirenal fat

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

3. 어미 마우스의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석

어미 마우스의 혈청 분석결과, 혈당, 고밀도 지질단백질 콜레스테롤 (High density lipoprotein- cholesterol, HDL-C), 고밀도 지질단백질 콜레스테롤 대비 총 콜레스테롤 비율 (Total Cholesterol/HDL-C), 간 내 손상도와 관련된 ALT와 AST는 고지방 식이에 의한 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 혈청 분석에서는 지질 지표 중 고밀도 지질단백질 콜레스테롤과 심혈관 질환과 관련된 TC/HDL-C 비율을 제외한 중성지방과 총 콜레스테롤에서 고지방 식이 어미군이 대조 식이 어미군에 비해 유의적으로 높은 수치를 보였다 (Table 3). 혈청 분석결과를 통해 어미 마우스의 지질 대사 조절에 문제가 있는 것으로 사료되며, 이와 관련하여 간에서의 대사적 변화가 있을 것으로 생각되었다.

고지방 식이군 어미 마우스의 낮은 간 무게와 관련하여, 지질 축적이 영향을 있는 지와 어미의 간 내 지질 대사의 문제가 있는지를 확인하기 위해, 간 내 지질 축적 정도를 측정한 결과는 다음과 같다. 간 내 중성지방 함량은 간 단백질로 보정하였을 때, 고지방 식이 어미군이 대조 식이 어미군보다 유의적으로 높았고, 콜레스테롤 함량은 유의적으로 낮게 나타났으며 (Table 3), g당 간 무게 보정에서도 위와 동일한 결과를 보였다 (중성지방; 대조 식이 어미군, 39.7 ± 1.4 mg/g liver, 고지방 식이 어미군, 53.8 ± 1.2 mg/g liver, $P < 0.05$, 콜레스테롤; 대조 식이 어미군, 2.62 ± 0.9 mg/g liver, 고지방 식이 어미군, 1.03 ± 0.11 mg/g liver, $P < 0.05$).

임신기 간 내 담즙은 임신기간 중 태아에서 배출하지 못한 담즙을 어미에게 이동시켜 배출 및 축적하는 것으로 알려져 있다. 이와 관련하여 본 실험에서 간 내 담즙은 간의 크기 증가와의 체내 독성의 가능성을 확인하기 위해 측정 하였으나, 식이에 따른 군간의 차이는 나타나지 않았다 (Table 3).

종합적으로 간 조직 내 중성지방, 콜레스테롤 및 담즙의 축적량을 확인하였을 때, 이 축적량이 어미 마우스의 간에서 군간의 유의적인 무게차이를 나타내는 요인은 아닐 것으로 생각되나, 혈청 및 간 내 중성지방과 콜레스테롤의 유의적인 차이를 통해 어미에게 지질 대사상의 변화가 일어난 것으로 사료되었다.

Table 3. Serum and hepatic biochemical parameters of dams

Group	CON (n=7)	HFD (n=5)
Serum		
Glucose (mg/dL)	126.3 ± 17.0	170.1 ± 18.4
TG (mg/dL)	25.9 ± 2.6	40.0 ± 4.5 *
TC (mg/dL)	78.8 ± 6.2	112.9 ± 11.3 *
HDL-C (mg/dL)	45.2 ± 2.8	64.0 ± 8.7
TC/HDL-C ratio	1.78 ± 0.17	1.82 ± 0.11
Protein (mg/dL)	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1
ALT (IU/L)	6.4 ± 0.8	6.20 ± 1.2
AST (IU/L)	46.6 ± 2.2	46.8 ± 7.7
Liver		
TG (µg/mg protein)	217.3 ± 7.2	271.7 ± 7.4 *
Cholesterol (µg/mg protein)	14.4 ± 0.9	5.2 ± 0.6 *
Total bile acids (µmol/g)	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.03

Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

ALT; Alanine transaminase, AST; Aspartate aminotransferase, CON; Control diet group, TG; Triacylglycerol, TC; Total cholesterol, HDL-C; High density lipoprotein-cholesterol, HFD; High fat diet group

4. 어미 마우스의 간 내 지질 대사 관련 유전자 발현

앞선 결과를 통해 고지방 식이를 섭취한 어미 마우스의 혈중, 간 내 지질 변화를 관찰하였고, 이에 따른 간 내 대사 기전의 변화를 확인하기 위해 mRNA 수준에서 중성지방 대사, 콜레스테롤 대사 및 지단백질 수송 관련 지표를 측정하였다. 중성지방 대사에서는 지질 및 지단백질 대사와 관련된 PPAR α , 지방조직의 생성, 세포 분화 및 인슐린 신호 전달과 관련된 PPAR γ 와 같은 주요 전사인자의 유전자 발현 차이가 나타나지 않았고, 지방산 합성 효소인 Fatty acid synthase (FASN), 지방산의 β -산화 관련 효소인 Carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a)의 유전자 발현에서도 역시 유의미한 군간의 차이를 나타내지 않았다. 단일 불포화 지방 합성 효소인 Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)의 유전자 발현에서만 고지방 식이를 섭취한 어미군에서 유의적으로 낮은 수치를 보였는데, 이는 초저밀도 지질단백질 (Very low-density lipoprotein, VLDL)의 포화지방산의 간 내 축적을 증가시켜 대사상의 문제를 나타낼 것으로 사료된다 (Figure 3). 콜레스테롤 대사 관련 유전자는 전사인자 수준에서 FXR, SREBP-2, LXR과 그 하위 유전자 중 지단백질 수용체인 LDLR과 스테롤 수송체인 ATP-binding cassette, sub-family G member 8 (ABCG8)의 유전자 발현이 고지방 식이 어미군에서 유의적으로 높게 나타났다. 그 밖의 콜레스테롤 생합성의 제한 효소인 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR)와 담즙 생성의 제한 효소인 Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1)의 유전자 발현은 군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Figure 3). 따라서 고지방 식이 어미군에서 나타나는 높은 혈중 콜레스테롤 및 낮은 간 내 콜레스테롤은 콜레스테롤의 생합성보다 간 내 운송 유전체의 변화로 인한 현상으로 사료된다.

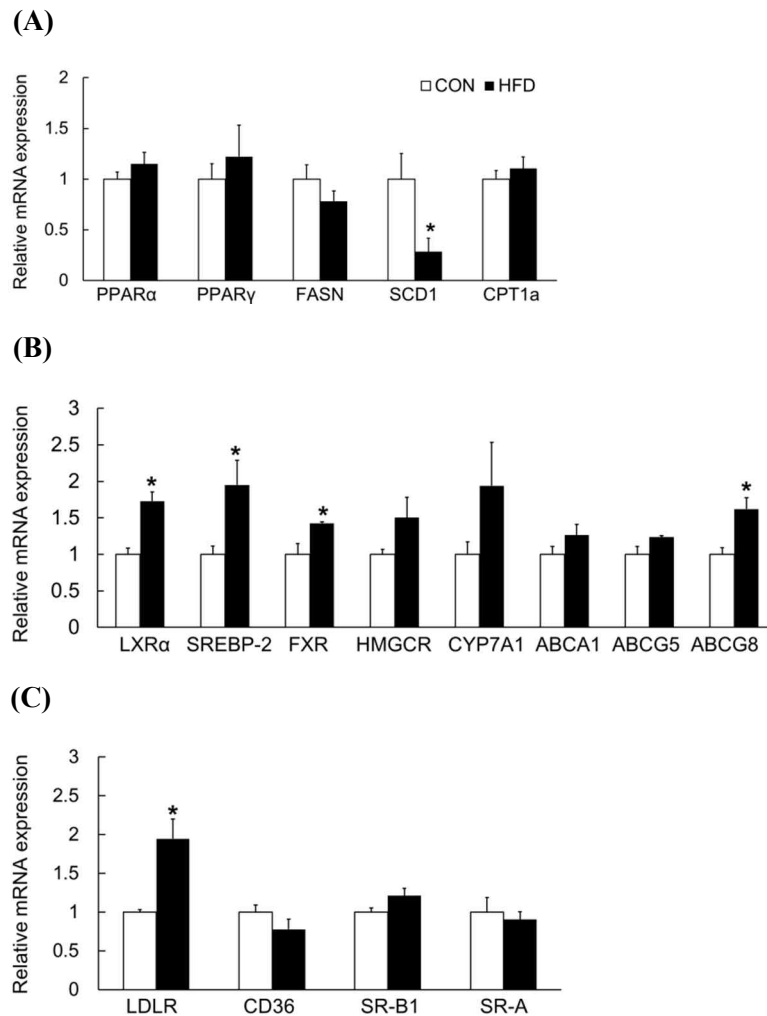


Figure 3. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in lipid metabolism.

Expression of genes involved in (A) triacylglycerol metabolism, (B) cholesterol metabolism and (C) lipoprotein transport. Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

5. 어미 마우스의 간 세포 증식

군간의 간 무게 차이를 규명하기 위해 간 조직의 세포 증식을 실험적으로 확인해 보았다. 임신기에는 늘어나는 대사요구량을 충족하기 위해 간에서 과증식(hyperplasia)과 비대(hypertrophy)가 일어나며 간 내 총 DNA 함량 및 총 단백질 함량이 증가하고, 수유기에는 증식 없이 그 크기가 유지된다 (Bustamante et al., 2010; Zou et al., 2013). 간 세포 증가는 간 내 총 DNA 양과 비례하며, 간 조직 g당 간세포의 조밀도가 늘어나는 것이 아닌 세포 수 증가로 전체 간 조직의 크기가 커지며 대사적 기능을 담당하는 세포수가 증가한다. 따라서 간 조직 g당 DNA 함량이 아닌 간 내 총 DNA 함량이 중요한 의미를 가진다. 또한, 간 내 총 단백질의 경우 간 내 지질 축적 등이 아닌, 대사적 활동이 가능한 세포 및 효소 등에 의해 증가한다. 따라서 본 실험에서는 고지방 식이의 어미에서 임신기의 간 증대의 저해가 일어났는가를 확인하기 위해 간 조직 내 총 DNA 함량과 총 단백질 함량을 측정하였다. 실험 결과 고지방 식이 어미군에서 대조 식이 어미군에 비해 총 DNA 양과 단백질 양 모두 유의적으로 낮은 결과를 보였다 (Figure 4). 이를 통해 임신기에 일어나야 할 증가한 대사 요구 충족을 위한 간 증대가 고지방 식이를 섭취한 어미 군에서는 정상적으로 나타나지 않은 것으로 사료되며, 이 때문에 군간의 간 조직 무게 및 체중 대비 상대 무게의 차이를 나타낸 것으로 보인다.

고지방 식이 어미 군에서 임신기의 정상적인 간 증대가 일어나지 않아, 이로 인한 수유기의 회복 성장(catch-up growth)이 일어났는지 확인하기 위해, 수유기 직후 어미의 간 내 세포 증식 (proliferation) 지표인 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)와 세포 사멸 (apoptosis) 지표로 세포 사멸 관련 효소인 caspase-3의 활성 절단형인 cleaved caspase-3 단백질을 Western blot으로 측정하였다. 측정결과, 고지방

식이 어미군에서 PCNA와 cleaved caspase-3 단백질 발현량 모두 군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Figure 5). 따라서, 낮은 간 조직 무게를 보인 고지방 식이를 섭취한 어미는 임신기의 간의 정상적인 간 증대가 충분히 일어나지 않았으며, 수유기의 간에서 회복 성장 역시 나타나지 않은 것으로 사료된다.

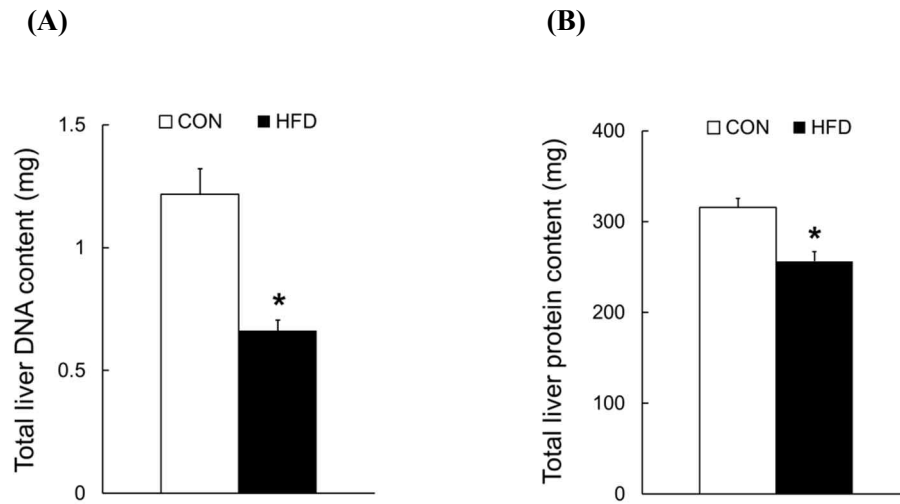


Figure 4. Effects of maternal high fat diet consumption on total liver DNA and protein contents of dams

Hepatic (A) total liver DNA content and (B) total protein content. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

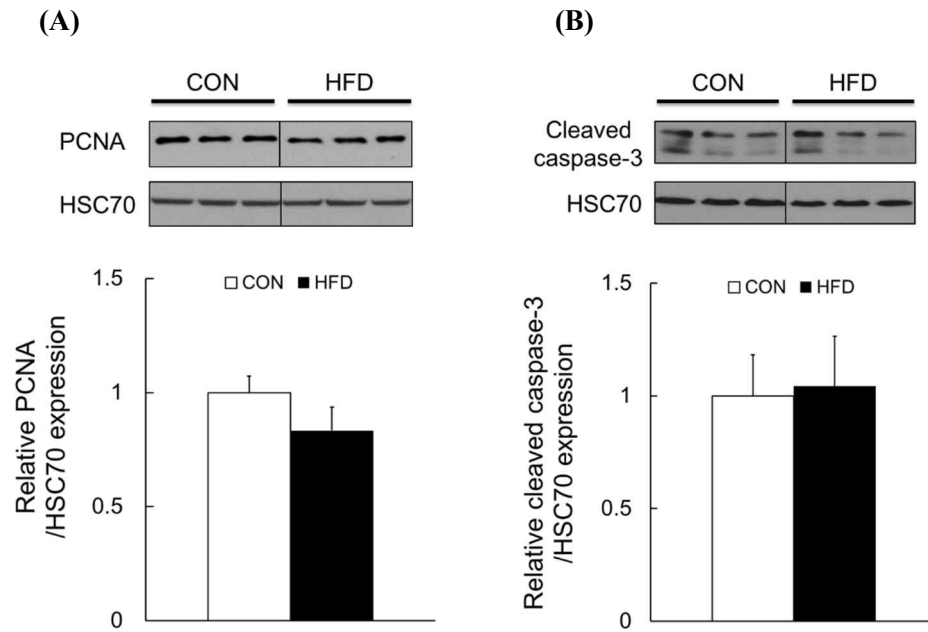


Figure 5. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic proliferation and apoptosis of dams.

Hepatic (A) PCNA and (B) cleaved caspase-3 protein of dam. The protein levels was analyzed by western blot and normalized to 70kDa heat shock cognate protein (HSC70). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

PCNA; Proliferating cell nuclear antigen, CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

6. 어미의 지질 과산화 및 산화스트레스와 염증

고지방 식이에 의한 고콜레스테롤혈증은 동물 모델에서 간 내 염증 반응의 위험인자로 알려져 있다 (Jeon et al., 2014). 지질 과산화는 세포 손상 기전의 일종으로 세포 내에서 산화 스트레스의 지표로써 측정된다. 본 실험에서 고지방 식이 섭취에 따른 어미의 지질 과산화 정도를 측정한 결과, 고지방 식이 어미군의 혈액과 간에서 모두 유의적으로 높은 수치를 보였다. 이와 관련하여 간 내 항산화 효소의 mRNA 발현 정도를 측정한 결과, 산화 스트레스에 의한 방어 기제로 작용하는 항산화 효소인 HO-1과 NADPH 산화효소 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)의 구성 요소인 p40phox의 유전자 발현이 유의적으로 낮게 나타났다 (Figure 6).

염증 대사를 확인하기 위해 MCP-1을 혈청과 간내 유전자 발현을 측정한 결과, 혈청에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 고지방 식이군의 간 내 mRNA 발현 정도는 유의적으로 높게 나타났다. 그 밖의 다른 염증 지표인 TNF α 와 CD68에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Figure 7). 종합적으로, 고지방 식이를 섭취한 어미는 산화 스트레스의 증가와 적절한 항산화 효소의 발현 증가가 나타나지 않아, 체내 산화 스트레스가 적절히 처리되지 않은 것으로 보인다.

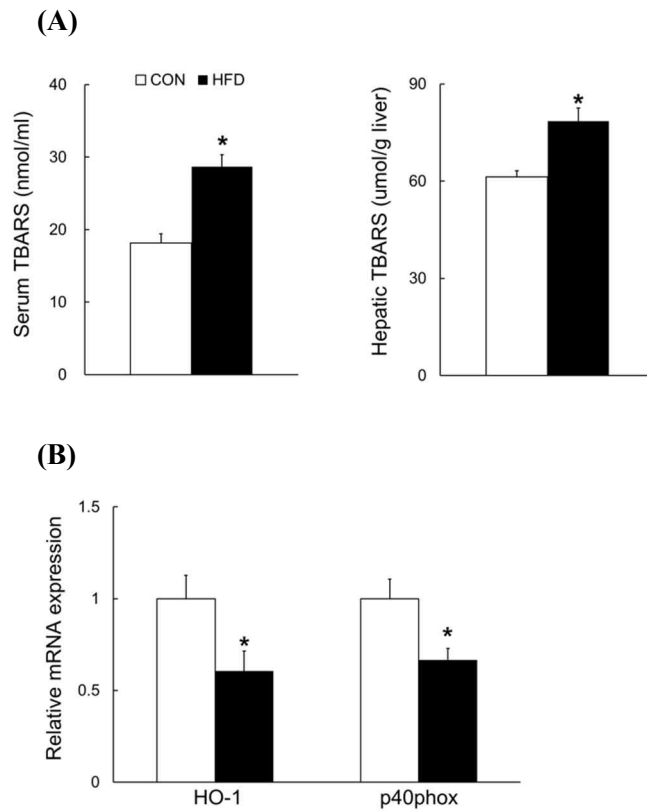


Figure 6. Effects of maternal high fat diet consumption on oxidative stress of dams

(A) Serum and hepatic TBARS levels and (B) relative mRNA expressions of HO-1 and p40phox of dams. Relative mRNA levels were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

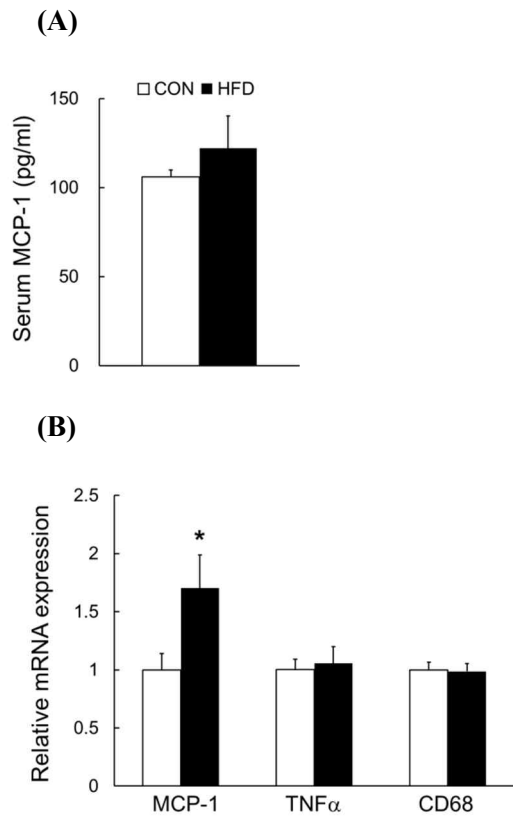


Figure 7. Effects of maternal high fat diet consumption on inflammation of dams

(A) Serum MCP-1 levels and (B) hepatic mRNA levels of genes involved in inflammation. Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P<0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

7. 자손의 체중 및 해부 시 조직 무게

실험기간 중 자손의 체중과 수유 직후 자손의 기관 무게를 측정한 결과는 다음과 같다. 체중은 수유 중의 측정 시점에서 모두 자손군 간의 유의적인 차이가 없었다 (Figure 8). 금식 후 생후 21 자손의 해부를 실시하여, 생명활동과 관련된 대사적 기관인 간, 자손에서 발달 상태를 확인할 수 있는 뇌, 면역관련 기관인 비장, 염증 및 혈압 관련 기관인 신장과 지질 축적기관인 지방의 조직 무게를 측정한 결과, 모든 기관에서 군간의 유의적인 차이는 없었다. 체중 대비 조직의 상대 무게는 지방에서만 고지방식이 자손군이 유의적으로 높았고, 나머지 지표들은 군간의 차이가 나타나지 않았다 (Table 4).

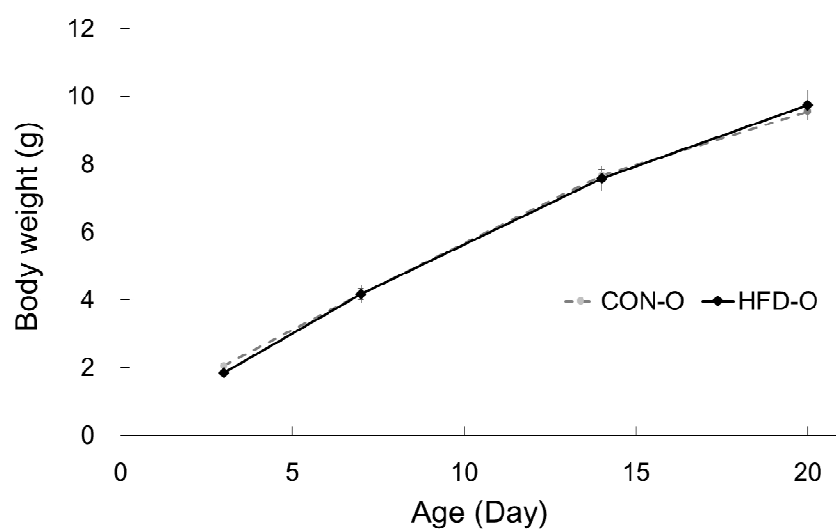


Figure 8. Body weight of male offspring during experimental period

Body weight of male offspring at postnatal day 3, 7, 14 and 20. Data are presented as mean \pm SEM (CON-O n=12, HFD-O n=7). * $P<0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

Table 4. Body and organ weight of male offspring

Group	CON-O (n = 12)	HFD-O (n = 7)
Body weight (g)	8.89 ± 0.12	9.10 ± 0.42
Organ weight (g)		
Liver	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.02
Brain	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00
Kidney†	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.01
Spleen	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Epididymal fat	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.01
Relative organ weight (% body weight)		
Liver	3.58 ± 0.09	3.82 ± 0.05
Brain	4.65 ± 0.08	4.60 ± 0.17
Kidney†	1.45 ± 0.03	0.14 ± 0.01
Spleen	0.63 ± 0.04	0.73 ± 0.05
Epididymal fat	0.42 ± 0.03	0.69 ± 0.11*

Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

† Sum of left and right kidney

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

8. 자손의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석 및 어미 지표와의 상관관계

어미의 고지방 식이에 따른 수컷 자손의 혈청을 분석한 결과는 다음과 같다. 혈당, 중성지방, ALT에서는 군간의 유의미한 차이를 보이지 않았고, 총 콜레스테롤에서 고지방 식이 자손군이 유의적으로 높은 값을 나타냈다. 자손의 간 내 지질 축적을 확인한 결과, 자손에서 중성지방과 콜레스테롤의 축적 정도는 단백질로 보정했을 때 유의적인 차이가 없었으며 (Table 5), 간 무게로 보정했을 때 역시 식이 섭취 군간의 차이가 없었다. (중성지방; 대조 식이 자손군, 12.6 ± 0.4 mg/g liver, 고지방 식이 자손군, 12.0 ± 1.1 mg/g liver, $P=0.413$, 콜레스테롤; 대조 식이 자손군, 1.6 ± 0.1 mg/g liver, 고지방 식이 자손군, 1.6 ± 0.1 mg/g liver, $P=0.583$). 추가적으로 H&E 염색을 통해, 각각 100배율, 200배율로 간 내 축적된 지방 구의 크기를 확인하였으나 군간의 큰 차이는 보이지 않았다 (Figure 9).

자손에서 고지방 식이섭취의 영향을 나타내는 혈중 콜레스테롤과 어미 지표간의 상관관계를 확인해본 결과, 어미의 간 무게와 음의 상관관계 ($r=-0.782$, $P=0.013$), 간 TBARS 와 양의 상관관계 ($r=0.699$, $P=0.036$)을 나타냈다 (Figure 10).

Table 5. Serum and hepatic biochemical parameters of male offspring

Group		CON-O (n=12)	HFD-O (n=7)
Serum			
	Glucose(mg/dL)	119.6 ± 5.6	131.0 ± 12.1
	TG (mg/dL)	50.7 ± 4.2	60.1 ± 8.3
	TC (mg/dL)	81.3 ± 3.3	93.7 ± 3.7 *
	ALT (IU/L)	26.3 ± 3.9	38.6 ± 12.7
Liver			
	TG (µg/mg protein)	63.9 ± 1.9	66.5 ± 6.3
	Cholesterol (µg/mg protein)	8.2 ± 0.5	8.6 ± 0.4

Data are presented as mean ± SEM. * P<0.05 compared with CON-O (Student's t-test).

AST; Aspartate Aminotransferase, CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group, TC; Total cholesterol, TG; Triacylglycerol

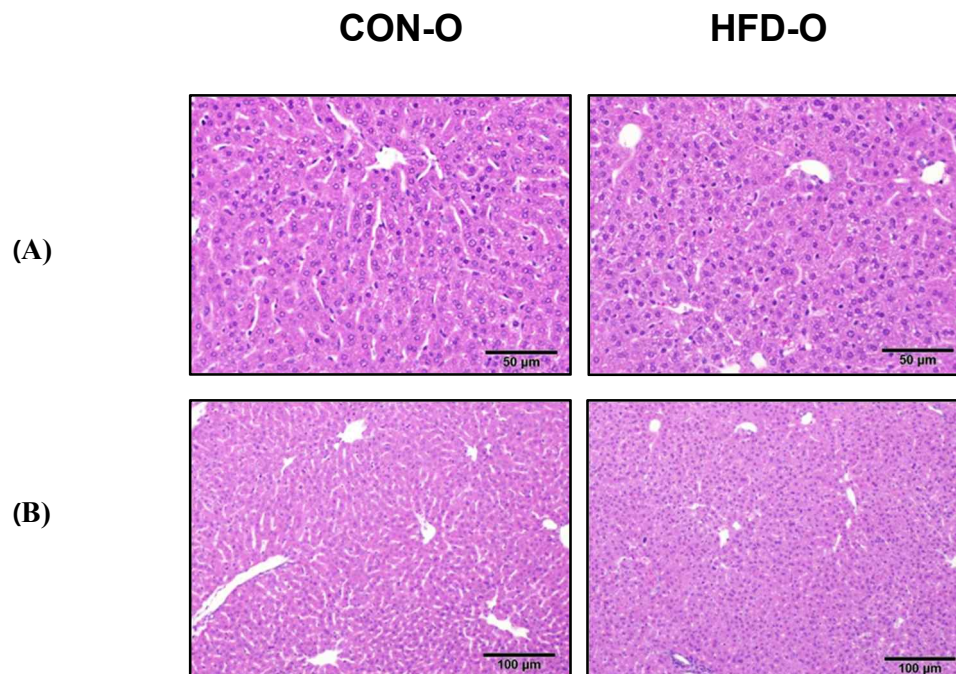


Figure 9. H&E staining of liver tissue sections of male offspring

H&E staining of offspring liver sections for histopathologic analysis (n=4 per group, magnification (A) x100 and (B) x200).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

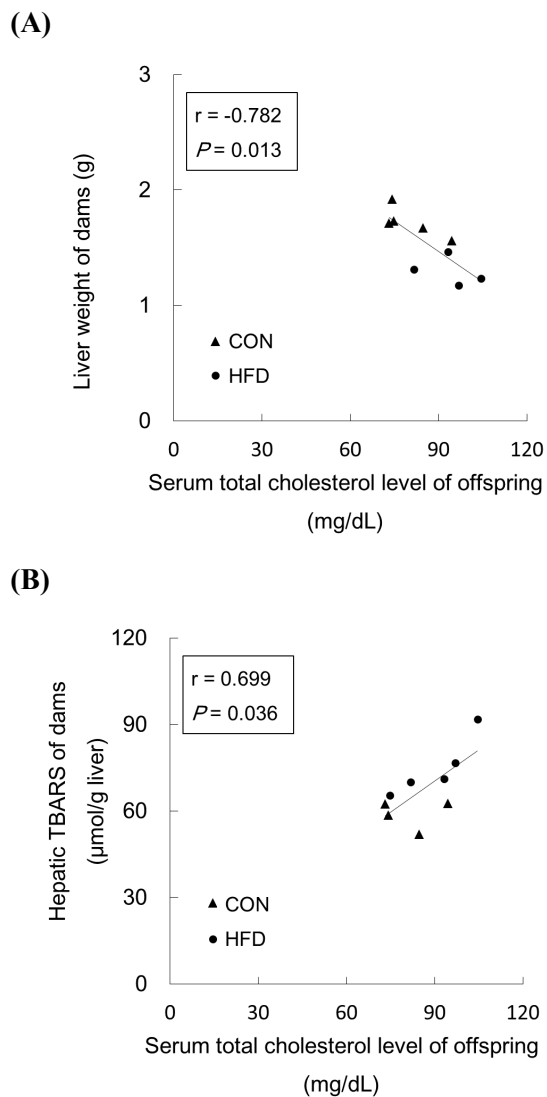


Figure 10. Correlation between offspring serum cholesterol level and dam biochemical parameters

Correlation between offspring serum cholesterol level and (A) liver weight of dams or (B) hepatic TBARS levels of dams. Pearson's correlation coefficient, r and p -value are indicated for each region.

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

9. 자손의 간 내 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현

혈청 콜레스테롤이 고지방 식이 자손군에서 높은 수치를 보여, 이와 관련된 간 내 mRNA 발현 차이를 확인하고자 하였다. 앞선 어미의 연구에서 유의적으로 나타난 전사인자인 $LXR\alpha$, SREBP-2, 지단백질 수용체인 LDLR, 스테롤 수송체인 ABCG, 콜레스테롤 생성의 제한 효소인 HMGCR 를 측정하였고, ABCG8 에서만 고지방 식이 자손군이 유의적으로 낮은 수치를 보여, 선행연구 (Mischke et al., 2013)와 동일하게 수컷 자손의 콜레스테롤 대사상의 변화는 간 내 콜레스테롤 생성의 차이가 아닌, 간 내 콜레스테롤 수송체 발현의 변화로 인한 표현형임을 관찰하였다 (Figure 11).

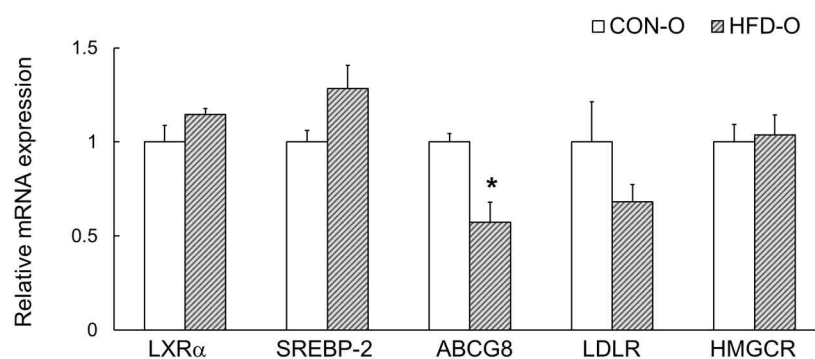


Figure 11. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in cholesterol metabolism of male offspring.

Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON-O n=6, HFD-O n=6). * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

10. 자손의 간 발달

본 연구에서 어미의 고지방 식이 섭취에 따른 수컷 자손의 간 발달 차이를 확인하기 위하여, 세포 증식지표인 PCNA, 간 발달 지표인 β -catenin (Apte et al., 2007)과 세포 사멸 지표인 cleaved caspase-3 를 Western blot 으로 측정된 결과, 군간의 유의적인 차이는 모두 나타나지 않았다 (Figure 12).

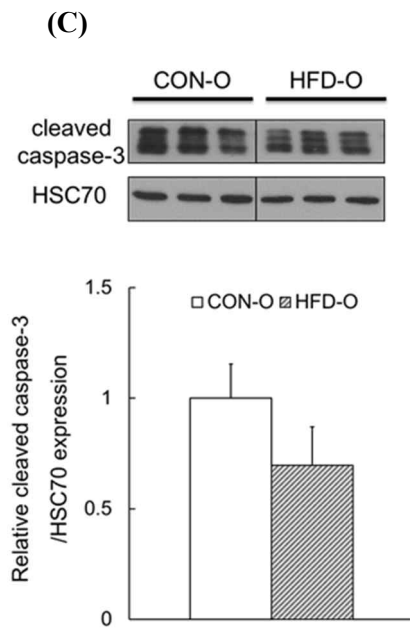
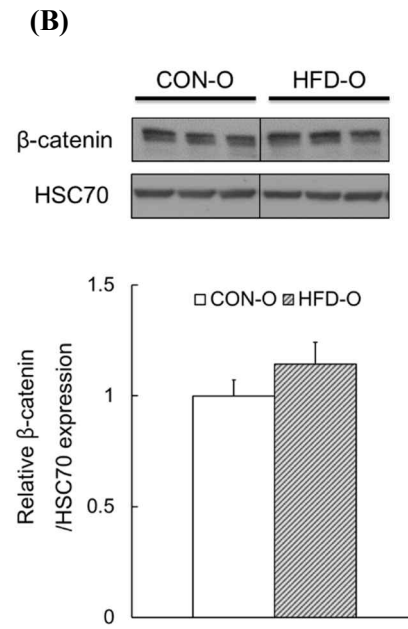
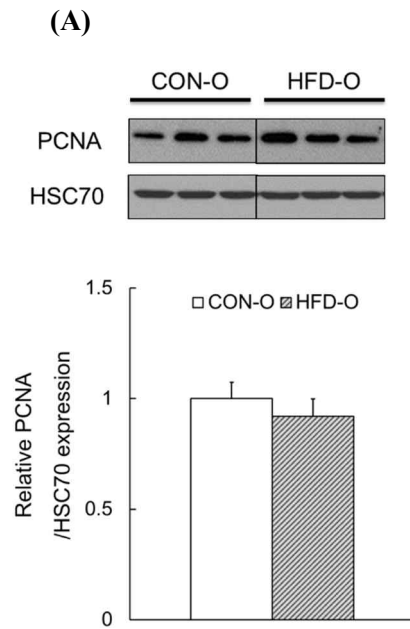


Figure 12. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic cell proliferation and apoptosis of male offspring

Relative hepatic (A) PCNA, (B) β -catenin, and (C) cleaved caspase-3 protein levels of male offspring. Representative immunoblot of each protein was normalized to HSC70. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

11. 자손의 간 내 산화스트레스 및 염증 유전자 발현

자손의 기능 대사적 변화를 확인하기 위해 앞선 어미에서 측정하여 군간 차이를 나타낸, 간 내 항산화 효소 유전자와 염증 유전자 발현을 확인해보았다. 항산화 효소인 HO-1, p40phox 와 염증지표인 MCP-1 유전자 발현 정도는 모두 자손군 간의 유의적인 차이가 없었다 (Figure 13). 이를 통해 본 연구에서 어미의 고지방 식이에 따른 자손의 항산화 및 염증 대사의 차이는 나타나지 않았다고 사료된다.

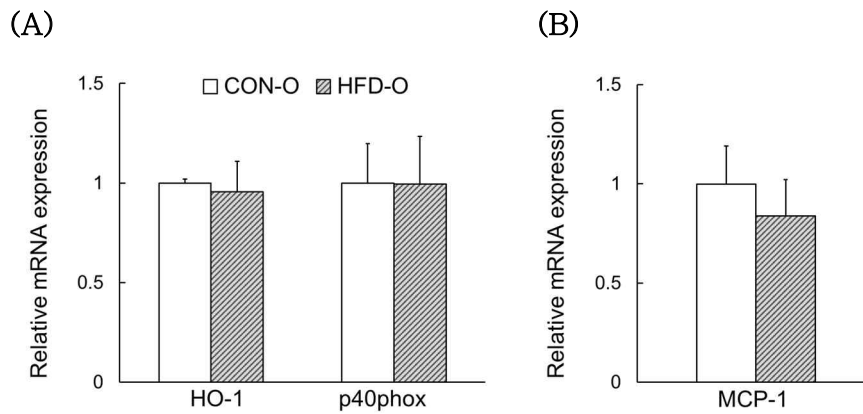


Figure 13. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA expression of anti-oxidative enzyme and inflammation of male offspring.

Relative mRNA expressions of genes involved in (A) anti-oxidative enzyme and (B) inflammation. Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON-O n=6, HFD-O n=6). * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

IV. 고찰

본 연구에서는 암컷 C57BL/6 마우스에게 대조 식이와 고지방 식이를 임신 전 3주, 임신기 및 수유기동안 제공한 후, 어미의 생리화학적 변화 및 간 내 유전자 변화를 분석하여 자손의 대사적 변화와의 상관관계를 확인해보았다. 실험 결과를 통해 고지방 식이를 섭취한 어미 군과 그 자손군의 지질 대사 변화를 관찰할 수 있었다. 또한, 어미의 고지방 식이 섭취가 임신기에 정상적으로 이루어져야 할 간 중대를 저해하고 산화 스트레스를 유발하며, 이러한 대사상 문제로 인해 자손에서 적절한 콜레스테롤 조절이 이루어지지 않음을 관찰하였다.

실험군은 임신 전, 임신기 및 수유기동안 고지방 식이군의 에너지 섭취량이 유의적으로 높은 고지방 고에너지 섭취 모델로, 대조군과는 다양한 해부학적, 생화학적 차이를 나타내었다. 본 연구는 선행연구들을 통해 고지방 섭취시 어미에서 변화하는 것으로 보고되는 지표들인 지질 대사, 세포 주기 및 증식, 산화 스트레스, 염증 지표를 측정하고, 자손의 지표 변화와의 상관관계를 알아보고자 하였다. 또한, 수유직후 고지방 식이 어미 군에서 높게 나타나던 간 조직 무게가 (Shankar et al., 2010) 본 연구에서는 반대로 더 낮은 값을 보여, 그 원인을 찾는 데에 초점을 맞추었다.

고지방 식이로 인한 어미 마우스의 간 무게가 지질 축적과 연관 있는지 확인하고, 지질 대사의 변화 유무를 관찰하기 위해, 혈중 및 간 내 지질 축적 정도를 측정하였다. 혈중 지표 중 지질 대사관련 지표인 중성지방 및 콜레스테롤은 고지방 식이군에서 모두 유의적으로 높은 값을 보였고, 간 내 지질 중 중성지방은 고지방 식이군에서, 콜레스테롤은 대조 식이군에서 유의적으로 높은 값을 보였다. 중성지방의 경우 고지방 식이를 섭취한

어미군에서 혈중, 간 축적량 모두 높게 나타났으며, 해부시 지방조직의 무게 역시 유의적으로 높았다. 이와 관련된 대사적 기전을 확인하였을 때, 주요 전사인자, 지방 합성, β -산화 관련 유전자 발현량에서 모두 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 단일 불포화 지방산 합성 효소인 SCD1만 고지방 식이 어미군에서 유의적으로 낮은 유전자 발현량을 보였다. 이를 통해 군간의 간 내 중성지방 대사 유전자의 발현의 차이가 없음에도 불구하고, 전체적인 중성지방은 고지방 식이를 통해 지방조직 저장량 이상으로 과도하게 축적되어, 혈중 및 간 내에서 높은 수치를 나타낸 것으로 보인다. 또한, SCD1의 mRNA 발현량 감소로 어미의 간 내 불포화 지방산 합성이 저해되고, 포화지방산의 축적이 유발되며, 포화지방산으로 인한 지방간과 같은 지질 관련 질환이 유발되기 쉬울 것으로 사료된다 (Geng et al., 2015). 콜레스테롤 분석 결과에서는, 중성지방과 달리 혈액과 간 조직 사이에 서로 다른 경향을 보였다. 간 조직에서는 콜레스테롤 관련 전사인자인 LXR α , SREBP-2과 그 하위 인자인 스테롤 수송체 ABCG8 및 지단백질 수용체 LDLR의 mRNA 발현량 증가를 관찰하였다. 간 내 콜레스테롤의 생합성은 주로 SREBP-2의 발현에 의해 조절되므로, 본 실험의 고지방 식이군의 간 내 SREBP-2의 활성 증가 현상은 간 세포 내 낮은 콜레스테롤 함량에 대한 반응으로 사료되며 (Goharkhay et al., 2008), 하위 유전자인 지단백질 수용체 LDLR 유전자 발현의 증가 또한 관련이 있을 것으로 생각된다. 따라서 콜레스테롤의 혈중 및 간 내 경향은 생성 및 배출량의 변화 보다는, 위와 같은 유전자 발현의 차이로 인해 콜레스테롤의 유입이 혈중에서 간 내로 적절하게 이루어지지 않아, 혈중 농도는 높은 수치로 유지되고, 간 축적량은 낮게 나타난 것과 연관 있을 것으로 사료된다. 추가적으로, 본 실험에서는 대표적 지질인 중성지방 및 콜레스테롤 외에 간 내 담즙 축적량을 측정하였다. 임신기간 중 태아에서

배출하지 못한 담즙은 어미에서 대사되며 이를 통해 간 내 담즙 축적 및 배출이 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Marin et al., 2008; Papacleovoulou et al., 2011; Zhu et al., 2013). 본 실험에서는 임신기간 중 고지방식으로 인해 이 대사에 문제가 생길 경우 담즙산 배출능력이 손상될 것이며, 그에 따른 독성 효과로 자손의 생화학적 대사가 영향을 받았을 것으로 가정하였다. 그러나 어미의 간 내 담즙 축적량과 간 내 담즙 배출의 주요 유전자인 BSEP의 발현량을 측정한 결과, 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (각각 $P=0.881$, $P=0.858$). 따라서 고지방 식이로 인한 담즙 축적 및 배출 대사의 불균형이 형성되었다고 생각하기 어렵고, 이로 인한 어미의 간 독성 및 간 증대를 설명할 수 없을 것으로 사료된다. 종합적으로, 고지방 식이 섭취로 인해 어미의 간 조직 내 중성지방, 콜레스테롤의 대사적인 변화를 관찰하였으나, 간 지질 및 담즙의 절대적인 축적량을 확인하였을 때, 이 축적량이 어미 마우스의 간에서 군간의 유의적인 무게 차이를 설명하기는 어려울 것으로 사료된다.

특이적으로, 임신기 어미의 간 조직은 증가하는 대사적 요구량으로 인해 세포 크기 증가와 세포 수 증식을 진행하며 (Zou et al., 2013), 이러한 임신기동안 변화된 간 조직은 수유기동안 유지되는 것으로 알려져있다 (Bustamante et al., 2010). 본 연구에서는 출산 직후까지의 어미의 체중은 군간 유의적인 차이가 없었고, 수유기에 이르러 고지방 식이 섭취 군의 체중이 유의적으로 높게 나타났다. 본 연구에서는 임신기까지 군간의 유의적인 체중차이가 없었고, 수유기가 종료된 시점에는 고지방 식이 어미군의 체중이 더 높아졌음에도 불구하고, 임신기동안의 체중의 증가의 영향을 받는 것으로 알려져 있는 간 조직의 무게가 유의적으로 낮았다. 이는 선행 연구에서와는 (Shankar et al., 2010) 다른 표현형이므로, 이 현상을 규명하기 위해 간 지질 외에 총 DNA 함량과 단백질 함량 측정을

실시하였다. 임신기의 간은 세포 증식을 통해 태아 및 태반 성장을 위한 대사적 요구를 수용하고, 이에 따라 비례적으로 총 DNA 함량의 증가, 간 조직 크기의 증가와 같은 특징을 나타낸다. 이 때 간은 세포의 밀도가 늘어나는 변화 대신, 대사적 기능을 담당하는 세포 수의 증가를 통해 간 조직 전체의 DNA 함량을 증가시킨다. 따라서 간 조직 g 당 DNA 함량이 아닌 간 조직 내 총 DNA 함량이 중요한 의미를 가진다. 또한 총 단백질 함량은 간 조직 무게 증가가 지질 축적 등으로 인한 증가가 아니며, 대사적 활동이 가능한 세포 및 효소 등에 의한 증가임을 확인하기 위해 추가적으로 측정 하였다. 실험결과 고지방 섭취 어미 군의 총 DNA 및 단백질 함량이 모두 유의적으로 낮게 나타났고, 수유기가 종료된 직후인 출산 후 21일에서 PCNA와 cleaved caspase-3 단백질 발현의 유의적인 차이가 나타나지 않은 것을 관찰하였다. 간 내 총 DNA 함량과 단백질 함량은 간의 증대와 비례하는데, 본 실험 결과를 통해 고지방 섭취 어미 군에서 임신기에 정상적인 간 증대가 이루어지지 않았으며, 수유기간동안 이 간 증대를 회복하기 위한 보충(catch-up growth) 작용 역시 나타나지 않았음을 시사한다.

고지방식이를 섭취한 어미의 간은 임신기의 간 증대의 저해와 더불어 과산화물 처리 기능을 적절히 수행하지 못한 것으로 사료된다. 선행연구들에서는 출산 전후의 산화 스트레스가 산화 지질 및 단백질 복합체 혹은 유전자 발현 조절을 통해, 자손이 대사적 질환에 영향 받기 쉬운 환경을 형성하는 것으로 보고하고 있으며 (Al-Gubory et al., 2010; Sen and Simmons, 2010), 특히 oxysterol을 통한 태아의 부적절한 발달에 대한 영향이 보고되고 있다 (Baardman et al., 2013). 이를 통해 임신 전 및 임신기 어미의 부적절한 과산화 상태가 자손의 성장 및 발달과 성인기 질병 유발에 영향을 미친다는 점을 시사한다 (Al-Gubory et al.,

2010). 본 연구의 결과에서는 선행 논문들에서 보고된 바와 같이 임신 및 수유기의 고지방 식이 섭취에 의한 간 내 높은 염증 사이토카인이 확인되었다 (Ashino et al., 2012). 간 외의 다른 조직 중 지방조직에서는 임신기의 비만 상태가 지방조직에서 분비되는 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 통해 태반에서 산화 스트레스 및 염증을 유발하는 것으로 보고되었다 (Ashino et al., 2012). 또한, 고지방 섭취는 유선 조직의 모유 생성 및 분비의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 유선 조직 내 세로토닌 생합성 증가로 염증 반응을 촉진할 수 있는 것으로 생각된다 (Hernandez et al., 2012).

임신기의 어미 체중과 수유기 중 자손 체중이 유의미한 군간의 차이를 나타내지 않았다. 이는 상대적으로 낮은 지방 함량의 실험 식이 (총 에너지 중 45% 지방)와 비교적 짧은 임신 전 식이 제공기간의 영향일 것일 가능성이 있다. 단순히 고지방 식이를 섭취하는 것뿐만 아니라, 어미의 체중 변화가 자손의 대사 변화에 본 연구와는 다른 방향의 영향을 미칠 것으로 예상되므로 (Shankar et al., 2010), 본 연구의 결과를 바탕으로 후속연구에서는 식이 내 지방 함유비율 및 기간을 모두 고려한 실험적 설계를 권장하는 바이다.

수유 종료 직후 자손 분석 결과, 절대 및 체중 대비 상대 간 무게, 간 세포 증식, 성장 및 발달의 차이가 나타나지 않았다. β -catenin은 세포 증식, 분화와 배아기 간 발달 등 세포의 분열이 많이 일어나는 시기에 활성화 되며, 마우스의 경우 10일에서 15일 째 배아 및 출생 후 5일에서 20일 간에 활성을 나타내어 간 발달의 정도를 나타낸다 (Apte et al., 2007), 고지방, 고자당(high sucrose)를 포함한 western-style 식이를 섭취한 어미의 생후 14일의 수컷 자손에서 Wnt/ β -catenin 경로 억제를 통한 간 발달 저해가 일어남이 한 선행연구를 통해 보고되었다 (Mischke

et al., 2013). β -catenin 발현량을 비교하여, 이 연구를 생후 21의 자손 분석인 본 실험과 비교하였을 때, 자손 간의 발달 저해가 회복 성장을 통해 생후 21일에서 회복되었을 것으로 사료된다. 또한, 동일한 연구에서 생후14일 시기의 간 내 낮은 콜레스테롤 수치가 본 연구에서는 관찰되지 않았는데, 이는 식이에 의해 일어난 Wnt/ β -catenin 경로 저해와 간 세포 증식 저해가 수유기 종료시인 β -catenin의 회복 전에 이미 자손의 콜레스테롤 조절 문제를 야기한 것으로 생각된다 (Mischke et al., 2013).

고지방 식이 섭취로 인해 서로 영향을 미칠 것으로 예상되는, 어미의 혈중 지질과 자손의 혈중 총 콜레스테롤과의 상관관계를 분석하였으나, 어미의 지질 대사 변화가 자손의 지질 대사에 유의적인 영향을 미치지 못함을 확인하였다 (중성지방; $r=0.146$, $P=0.707$, 콜레스테롤; $r=0.145$, $P=0.710$). 반면, 특이적으로 본 실험에서는 어미의 간 무게와 자손의 신장 무게간의 유의미한 상관관계를 확인할 수 있었다 ($r=-0.797$, $P=0.010$). 선행 연구에서는 임신기 래트의 저 단백 섭취에서 신장의 성장 및 발달의 저해를 관찰하였다 (Pham et al., 2003). 따라서 후속 연구에서는 고지방 식이가 신장의 발달에 미치는 영향에 대한 추가적인 고찰이 필요할 것으로 사료된다.

상관관계 분석 결과, 고지방 식이를 섭취한 어미의 간의 크기로 나타나는 임신기 대사적 성장 저해와 산화 스트레스의 증가가 자손의 혈중 콜레스테롤 상승과 유의적인 상관관계를 보였다. 그러나, 본 연구에서는 이러한 고지방 식이에 의한 어미의 임신기 간 증대 저해와 간 산화스트레스 증가가 자손의 콜레스테롤 대사에 영향을 미치기 위한 연결 고리를 명확히 밝히지 못하였고, 이를 해결하기 위해 어미 혈중 TBARS를 태아-어미 간의 매개체로 가정하여 다른 지표와의 상관관계를 확인하였다. 앞서 밝힌 어미 간 TBARS와 자손의 혈중 콜레스테롤과의 유의적인 음의 상관관계와

더불어, 어미의 간 TBARS와 혈중 TBARS의 상관관계가 유의적으로 양의 상관관계를 가지므로 ($r=0.672$, $P=0.047$), 혈중 TBARS를 통한 전달이 자손에게 영향을 미쳤을 것으로 예상할 수 있었다. 그러나 관련 분석결과, 어미의 혈중 TBARS와 자손의 혈중 콜레스테롤과의 상관성에서는 유의미한 상관관계를 나타내지 않았다 ($r=0.481$, $P=0.190$). 따라서, 추후 이를 연결하는 혈액 혹은 태반, 모유 등 다른 기전적인 원인에 대한 보다 명확한 심층 연구가 필요할 것이다.

본 연구는 수유 종료 직후인 한 개의 분석 시점을 사용하였기 때문에, 임신기 및 수유기의 다양한 체내 대사변화를 모두 관찰하는 데는 한계가 있었다. 특히, 수유기가 종료되는 출산 후 3주 시점에는 임신 및 수유기에 특이적으로 변화하는 대사 지표들이 ABCG8 및 지질 축적량 등 일부를 제외하고는 일반 성인기 수치로 되돌아가기 때문에 기전적으로 이를 모두 확인하기 어려웠다 (Aleksunes et al., 2012). 그러나 본 연구에서는 수유기까지 유지되는 임신기의 간 증대와 총 DNA 및 단백질 함량과의 관계를 통해, 직간접적으로 임신기의 간 변화를 고찰한데에 큰 의의가 있다.

결론적으로, 본 연구에서는 손상된 어미의 간 증대와 증가된 간 내 산화 스트레스가 자손의 지질 항상성 유지에 영향을 주었을 가능성을 제안하였다. 이후, 임신기에서 이러한 간 증대의 저해를 일으키는 고지방 식이의 어미와 자손을 연결하는 분자적 기전에 대한 여러 시기에 따른 후속 연구를 제안하는 바이다.

V. 요약 및 결론

고지방 관련 선행 연구들에서는 각 실험의 실험기간, 종 및 식이 조성 등 실험 조건에 따라 동일하게 고지방 식이를 연구한 결과임에도 자손의 체중 및 생화학 지표 등이 상이하게 나타나고 있다. 본 연구에서는 어미 마우스와 그 자손을 함께 분석하여 고지방식이 유발하는 어미의 어떠한 대사적 변화 요인이 자손의 대사적 변화와 관련 있는지를 고찰해 보았다.

본 실험에서 고지방 식이를 섭취한 어미에서 나타나는 대사적인 변화를 요약하면 다음과 같다. 첫째, 임신 전, 임신기 및 수유기동안 군간의 체중 차이는 수유기에서만 나타났고, 특이적으로 간 조직 무게 및 간 체중 비가 대조 식이군에 비해 고지방 식이군이 유의적으로 낮았다. 둘째, 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 간 중성지방의 경우 고지방 식이군에서 유의적으로 높았으나, 간 콜레스테롤은 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 지질 대사 및 지단백질 수용체의 유전자 발현을 확인한 결과, 불포화지방산 전환 대사와 콜레스테롤의 간 내 수송 대사의 문제를 관찰할 수 있었다. 셋째, 간 내 총 DNA 및 단백질 함량이 고지방 식이군에서 유의적으로 낮게 나타났으며, PCNA, cleaved caspase-3 단백질 발현의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 일반적으로 임신기에는 간 대사 요구량 증가 및 체중 증가로 간 증식이 활발히 일어나 간의 크기가 커지게 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험 결과는 고지방 식이로 인해 임신기 중 대사적 요구를 수용할 충분한 간 증대가 일어나지 않았음을 시사하며, 수유기 중 회복성장 역시 일어나지 않아 간 무게의 유의적인 차이를 보였다고 사료된다. 넷째, 고지방 식이군에서는 간 내 높은 지질 과산화물 수치와 더불어 항산화 효소의 mRNA 발현 감소를 보였다.

자손군의 분석 결과, 체중 및 해부 시 간, 뇌, 신장, 비장 조직 무게 및

상대 무게는 군간 유의적인 차이가 없었고, 상대 지방조직 무게에서만 유의적인 차이를 보였다. 혈청 분석 및 간 지질 분석에서는 혈중 콜레스테롤에서만 고지방식이 자손군의 수치가 유의적으로 높았으며, 관련하여 간 내 스테롤 수송체의 유전자 발현감소를 관찰하였다. 항산화 효소 지표와 염증지표에서는 군간의 유의미한 차이가 나타나지 않았다.

식이에 따른 어미와 그 자손 대사 지표의 상관관계를 확인해 본 결과, 자손의 혈중 콜레스테롤은 임신기 요구 대사 충족을 위한 간 증대의 결과인 간 조직 절대 무게와는 음의 상관관계를 ($r=-0.782$, $P=0.013$), 간 내 지질 과산화물인 TBARS와는 양의 상관관계 ($r=0.699$, $P=0.036$)를 나타냈다.

위의 결과를 종합하면, 본 연구에서는 고지방 식이를 섭취한 어미에서는 임신기에 불충분한 간 증대와 증가된 산화스트레스를 보이며, 이 같은 어미 마우스의 변화가 수유 직후의 자손의 콜레스테롤 조절에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Al-Gubory KH, Fowler PA and Garrel C (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(10): 1634-1650.
- Aleksunes LM, Yeager RL, Wen X, Cui JY and Klaassen CD (2012) Repression of hepatobiliary transporters and differential regulation of classic and alternative bile acid pathways in mice during pregnancy. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 130(2): 257-268.
- Alfaradhi MZ, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Musial B, Fowden A and Ozanne SE (2014) Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 307(1): R26-34.
- Amine E, Baba N, Belhadj M, Deurenbery-Yap M, Djazayery A, Forrester T, Galuska D, Herman S, James W and MBuyamba J (2002) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. World Health Organization.
- Aoki N, Yamaguchi Y, Ohira S and Matsuda T (1999) High fat feeding of lactating mice causing a drastic reduction in fat and energy content in milk without affecting the apparent growth of their pups and the production of major milk fat globule membrane components MFG-E8 and butyrophilin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 63(10): 1749-1755.
- Apte U, Zeng G, Thompson MD, Muller P, Micsenyi A, Cieply B, Kaestner KH and Monga SP (2007) beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 292(6): G1578-1585.
- Aranceta J and Perez-Rodrigo C (2012) Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *The British journal of nutrition* 107 Suppl 2: S8-22.
- Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, Torsoni AS and Torsoni MA (2012) Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *The Journal of nutritional biochemistry* 23(4): 341-348.
- Aye IL, Powell TL and Jansson T (2013) Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta* 34

Suppl: S40-45.

- Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Berger RM, Bakker MK, Hofstra RM and Plosch T (2013) The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights. *Biology of reproduction* 88(1): 24.
- Bringhenti I, Ornellas F, Martins MA, Mandarim-de-Lacerda CA and Aguila MB (2015) Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice. *Nutrition research* (New York, NY) 35(2): 136-145.
- Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA, McConnell JM and Byrne CD (2009) Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* (Baltimore, Md) 50(6): 1796-1808.
- Bustamante JJ, Copple BL, Soares MJ and Dai G (2010) Gene profiling of maternal hepatic adaptations to pregnancy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30(3): 406-415.
- Cannon MV, Buchner DA, Hester J, Miller H, Sehayek E, Nadeau JH and Serre D (2014) Maternal nutrition induces pervasive gene expression changes but no detectable DNA methylation differences in the liver of adult offspring. *PloS one* 9(3): e90335.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N and Rando OJ (2010) Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143(7): 1084-1096.
- Cetin I, Parisi F, Berti C, Mando C and Desoye G (2012) Placental fatty acid transport in maternal obesity. *Journal of developmental origins of health and disease* 3(6): 409-414.
- Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM and Hauguel-de Mouzon S (2008) Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 29(3): 274-281.
- Cianfarani S, Agostoni C, Bedogni G, Berni Canani R, Brambilla P, Nobili V and Pietrobelli A (2012) Effect of intrauterine growth retardation on liver and long-term metabolic risk. *International journal of obesity* (2005) 36(10): 1270-1277.
- Dai G, Bustamante JJ, Zou Y, Myronovych A, Bao Q, Kumar S and Soares MJ (2011) Maternal hepatic growth response to pregnancy in the mouse. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ) 236(11): 1322-1332.
- Du Y, Yang M, Lee S, Behrendt CL, Hooper LV, Saghatelian A and Wan Y (2012) Maternal western diet causes inflammatory milk and TLR2/4-dependent

- neonatal toxicity. *Genes & development* 26(12): 1306-1311.
- Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J and Vickers MH (2011) Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. *PloS one* 6(7): e21662.
- Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK and Hanson MA (2009) Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *The British journal of nutrition* 102(4): 514-519.
- Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226(1): 497-509.
- Franco JG, Fernandes TP, Rocha CP, Calvino C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Moura EG and Trevenzoli IH (2012) Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *The Journal of physiology* 590(Pt 21): 5503-5518.
- Gaccioli F, White V, Capobianco E, Powell TL, Jawerbaum A and Jansson T (2013) Maternal overweight induced by a diet with high content of saturated fat activates placental mTOR and eIF2alpha signaling and increases fetal growth in rats. *Biology of reproduction* 89(4): 96.
- Ge ZJ, Luo SM, Lin F, Liang QX, Huang L, Wei YC, Hou Y, Han ZM, Schatten H and Sun QY (2014) DNA methylation in oocytes and liver of female mice and their offspring: effects of high-fat-diet-induced obesity. *Environmental health perspectives* 122(2): 159-164.
- Geng T, Xia L, Russo S, Kamara D and Cowart LA (2015) Prosteatotic genes are associated with unsaturated fat suppression of saturated fat-induced hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Nutrition research (New York, NY)* 35(9): 812-822.
- Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C and Thornburg KL (2008) Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine* 359(1): 61-73.
- Godfrey KM and Barker DJ (2001) Fetal programming and adult health. *Public health nutrition* 4(2b): 611-624.
- Goharkhay N, Tamayo EH, Yin H, Hankins GD, Saade GR and Longo M (2008) Maternal hypercholesterolemia leads to activation of endogenous cholesterol synthesis in the offspring. *American journal of obstetrics and gynecology* 199(3): 273.e271-276.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM and Kliever SA

- (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular cell* 6(3): 517-526.
- Hartil K, Vuguin PM, Kruse M, Schmucl E, Fiallo A, Vargas C, Warner MJ, Durand JL, Jelicks LA and Charron MJ (2009) Maternal substrate utilization programs the development of the metabolic syndrome in male mice exposed to high fat in utero. *Pediatric research* 66(4): 368-373.
- Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA and Friedman JE (2010) Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 299(3): R711-722.
- Hernandez LL, Grayson BE, Yadav E, Seeley RJ and Horseman ND (2012) High fat diet alters lactation outcomes: possible involvement of inflammatory and serotonergic pathways. *PloS one* 7(3): e32598.
- Herrera E (2000) Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European journal of clinical nutrition* 54 Suppl 1: S47-51.
- Higa R and Jawerbaum A (2013) Intrauterine effects of impaired lipid homeostasis in pregnancy diseases. *Current medicinal chemistry* 20(18): 2338-2350.
- Hughes AN and Oxford JT (2014) A lipid-rich gestational diet predisposes offspring to nonalcoholic fatty liver disease: a potential sequence of events. *Hepatic medicine : evidence and research* 6: 15-23.
- Jeon S, Park YJ and Kwon YH (2014) Genistein alleviates the development of nonalcoholic steatohepatitis in ApoE(-/-) mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* 58(4): 830-841.
- Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL and Jansson T (2009) High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(1): 271-278.
- Larque E, Ruiz-Palacios M and Koletzko B (2013) Placental regulation of fetal nutrient supply. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 16(3): 292-297.
- Li M, Reynolds CM, Sloboda DM, Gray C and Vickers MH (2013) Effects of taurine supplementation on hepatic markers of inflammation and lipid metabolism in mothers and offspring in the setting of maternal obesity. *PloS one* 8(10): e76961.
- Li M, Sloboda DM and Vickers MH (2011) Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal

- models. *Experimental diabetes research* 2011: 592408.
- Li S, Tse IM and Li ET (2012) Maternal green tea extract supplementation to rats fed a high-fat diet ameliorates insulin resistance in adult male offspring. *The Journal of nutritional biochemistry* 23(12): 1655-1660.
- Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J and Mangelsdorf DJ (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Molecular cell* 6(3): 507-515.
- Marin JJ, Macias RI, Briz O, Perez MJ, Blazquez AG, Arrese M and Serrano MA (2008) Molecular bases of the fetal liver-placenta-maternal liver excretory pathway for cholephilic compounds. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28(4): 435-454.
- Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L and Martinez JA (2009) High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *Journal of physiology and biochemistry* 65(1): 1-9.
- Milona A, Owen BM, van Mil S, Dormann D, Mataki C, Boudjelal M, Cairns W, Schoonjans K, Milligan S, Parker M, White R and Williamson C (2010) The normal mechanisms of pregnancy-induced liver growth are not maintained in mice lacking the bile acid sensor Fxr. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 298(2): G151-158.
- Mischke M, Pruis MG, Boekschoten MV, Groen AK, Fitri AR, van de Heijning BJ, Verkade HJ, Muller M, Plosch T and Steegenga WT (2013) Maternal Western-style high fat diet induces sex-specific physiological and molecular changes in two-week-old mouse offspring. *PloS one* 8(11): e78623.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL and Norman RJ (2005) Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction (Cambridge, England)* 130(5): 583-597.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95(2): 351-358.
- Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S and Williamson C (2011) Nuclear receptor-driven alterations in bile acid and lipid metabolic pathways during gestation. *Biochimica et biophysica acta* 1812(8): 879-887.
- Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL and Lane RH (2003) Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 285(5): R962-970.
- Pruis MG, van Ewijk PA, Schrauwen-Hinderling VB and Plosch T (2014) Lipotoxicity and the role of maternal nutrition. *Acta physiologica (Oxford, England)* 210(2):

296-306.

- Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA and Sattar N (2002) Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 87(9): 4231-4237.
- Segovia SA, Vickers MH, Gray C and Reynolds CM (2014) Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *BioMed research international* 2014: 418975.
- Sen S and Simmons RA (2010) Maternal antioxidant supplementation prevents adiposity in the offspring of Western diet-fed rats. *Diabetes* 59(12): 3058-3065.
- Shankar K, Kang P, Harrell A, Zhong Y, Marecki JC, Ronis MJ and Badger TM (2010) Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology* 151(6): 2577-2589.
- Skogen JC and Overland S (2012) The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. *JRSM short reports* 3(8): 59.
- Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI and Moran TH (2009) Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58(5): 1116-1125.
- Waterland RA and Garza C (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American journal of clinical nutrition* 69(2): 179-197.
- WHO (2014) Global Health Observatory:(GHO). World Health Organization.
- Williams L, Seki Y, Vuguin PM and Charron MJ (2014) Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochimica et biophysica acta* 1842(3): 507-519.
- Williamson C and Geenes V (2014) Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 124(1): 120-133.
- Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ and Spencer TE (2004) Maternal nutrition and fetal development. *The Journal of nutrition* 134(9): 2169-2172.
- Yang KF, Cai W, Xu JL and Shi W (2012) Maternal high-fat diet programs Wnt genes through histone modification in the liver of neonatal rats. *Journal of molecular endocrinology* 49(2): 107-114.
- Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M, Xu J and Wang Z (2014) Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. *International journal of molecular sciences* 15(9): 14967-14983.
- Zhu MJ, Du M, Nathanielsz PW and Ford SP (2010) Maternal obesity up-regulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the

- mid-gestation sheep placenta. *Placenta* 31(5): 387-391.
- Zhu QN, Xie HM, Zhang D, Liu J and Lu YF (2013) Hepatic bile acids and bile acid-related gene expression in pregnant and lactating rats. *PeerJ* 1: e143.
- Zorn AM (2008) Liver development, in *StemBook*, Harvard Stem Cell Institute
Copyright: (c) 2008 Aaron M. Zorn., Cambridge (MA).
- Zou Y, Hu M, Bao Q, Chan JY and Dai G (2013) Nrf2 participates in regulating maternal hepatic adaptations to pregnancy. *Journal of cell science* 126(Pt 7): 1618-1625.

Abstract

Effects of maternal high fat diet on liver enlargement and oxidative stress of dams and lipid metabolism of offspring mice

Juyoung Kim

Department of Food and Nutrition

Graduate school

Seoul National University

Maternal nutrition affects development of diseases, such as type 2 diabetes, obesity, and non-alcoholic fatty liver disease in adult offspring. In spite of several previous animal studies of maternal high fat diet (HFD), transgenerational effects of HFD remain unclear because of their dissimilar results. Therefore, to determine which parameters of dams were associated with the metabolic outcomes in offspring, this study investigated the effects of maternal HFD consumption on metabolic phenotypes and hepatic gene expression of dams and offspring. Five-week-old virgin female C57BL/6 mice were used for this study. Experimental animals were randomly divided into two groups of a control diet (10% calories from fat) or a high fat diet (HFD: 45% calories from fat) and were provided these diets for three weeks before mating and during gestation and lactation. Dams and their male offspring were sacrificed at weaning. Body weights at weaning, adipose tissue weights, and serum triacylglycerol and total cholesterol levels of HFD-fed dams were higher than those of control diet fed

dams. Hepatic triacylglycerol levels were increased and stearyl-CoA desaturase mRNA levels were decreased by maternal HFD intake. In contrast, hepatic cholesterol levels of HFD-fed dams were significantly lower and mRNA levels of genes involved in cholesterol metabolism (LXR α , SREBP-2, FXR, LDLR, and ABCG8) of HFD-fed dams were significantly higher in comparison to those of control diet fed dams. Especially, lower liver weights of HFD-fed dams were measured in this study. Total DNA contents and total protein contents, which represent pregnancy-induced liver enlargement for metabolic demand, were decreased by maternal HFD consumption. Hepatic protein levels of proliferating cell nuclear antigen and cleaved caspase-3 were measured to investigate catch-up growth during lactation, but there were no significant differences between the two groups. In the point of oxidative stress metabolism, increased 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in serum and liver and decreased hepatic mRNA expression levels of anti-oxidative enzymes including heme oxygenase-1 and p40phox were observed in HFD-fed dams. In the offspring of HFD fed dams, relative adipose tissue weights and serum cholesterol levels were significantly higher than the offspring of control diet fed dams. Significantly lower hepatic gene expression levels of sterol transporter, ABCG8 were observed in the offspring of HFD-fed dams. Based on these results, serum cholesterol levels of offspring had a negative correlation with the liver weights of dams and a positive correlation with the hepatic lipid peroxidation levels of dams. In conclusion, this study suggests that maternal HFD disturbed an anti-oxidative system and pregnancy-related liver adaptation of dams, and these maternal metabolic changes affected cholesterol metabolism regulation of postnatal day 21 of offspring.

Keywords: maternal high fat diet, offspring, liver, pregnancy-induced liver enlargement, oxidative stress, cholesterol metabolism

Student number: 2014-20362



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

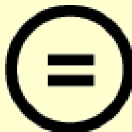
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

어미 마우스의 고지방 식이 섭취가
어미의 간 증대 및 산화 스트레스와
자손의 지질 대사에 미치는 영향

Effects of maternal high fat diet on
liver enlargement and oxidative stress of dams
and lipid metabolism of offspring mice

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

식품영양학과

김 주 영

국문 초록

어미 마우스의 고지방 식이 섭취가 어미의 간 증대 및 산화 스트레스와 자손의 지질 대사에 미치는 영향

서울대학교 대학원

식품영양학과

김주영

임신 및 수유기 모체의 영양 섭취 상태는 자손의 성장과 발달의 중요 요인으로 알려져 있다. 선행 동물 연구들에서 어미의 고지방 섭취가 자손의 비만과 인슐린 저항성, 비알코올성 지방간 (Non-alcoholic fatty liver disease) 등의 질환 발병에 영향을 주는 것으로 보고되고 있으나, 고지방 식이 제공기간, 고지방 식이의 지방 구성에 따라, 자손의 출생 체중, 간 지질, 혈중 지질 등의 지표 측정 결과가 연구마다 상이하게 보고되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 어미의 고지방 식이 섭취로 인한 어미와 자손의 생화학 지표 및 간 내 유전자 발현 변화를 측정하고, 어미와 자손의 대사 변화 간 상관관계 분석을 통해 세대간 영향을 확인하고자 하였다. 5주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 임의로 대조 식이군 (CON; 총 에너지 중 10% 지방)과 고지방 식이군 (HFD; 총 에너지 중 45% 지방)으로 나누어 임신

3주전부터 실험 식이 제공을 시작한 후, 동일한 종 및 주령의 수컷 마우스와 교배하였으며, 임신기 및 수유기동안 동일한 식이를 유지하였다. 어미와 그 수컷 자손은 수유가 끝난 직후인 생후 21일에 희생하여 분석하였다. 고지방 식이 어미군은 희생 시 체중, 지방조직 무게, 혈청 중성지방 및 총 콜레스테롤에서 대조 식이 어미군에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 간 지질의 경우 고지방 식이 어미군이 유의적으로 높은 중성지방 함량과 낮은 콜레스테롤 함량을 보였으며, 이와 관련하여 간 내 유전자 발현을 측정한 결과, 불포화 지방산 전환, 콜레스테롤 대사 관련 전사인자와 지단백질 수용체 및 스테롤 수송체 발현의 차이를 나타냈다. 특이적으로 본 연구에서는 고지방 식이군에서 대조 식이군 대비 낮은 간 무게가 관찰되었다. 임신기의 간 증대를 반영하는 간 내 총 DNA 함량과 단백질 함량을 측정한 결과, 고지방 식이를 섭취한 어미군에서 유의적으로 낮았다. 또한, 수유기동안 간 조직의 catch-up growth가 일어났는지를 확인하기 위해 세포증식 지표인 proliferating cell nuclear antigen와 세포 사멸 지표인 cleaved caspase-3의 단백질 발현 정도를 측정하였고, 군간의 유의미한 차이는 나타나지 않았다. 산화스트레스의 관점에서는, 혈청 및 간 내 2-Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 측정을 통해 고지방 식이군에서 지질 과산화의 유의적인 증가를 확인하였고, 항산화 효소 유전자인 heme oxygenase-1과 p40phox의 발현이 대조 식이군에 비해 유의적으로 낮아짐을 확인하였다. 자손의 분석결과, 출생 체중과 해부 시 체중 및 뇌, 간 조직 무게는 차이를 보이지 않은 반면, 고지방 식이 자손군에서 지방의 상대 무게가 유의적으로 높게 나타났다. 고지방 식이 자손군에서 높은 혈중 콜레스테롤을 보였으며, 콜레스테롤 관련 전사 인자와 생합성 관련 효소의 유전자 발현은 차이를 보이지 않은 반면, 스테롤 수송체인 ATP-binding cassette sub-family G member

8에서 유의적으로 낮은 유전자 발현량을 보였다. 어미와 자손의 결과를 종합하여 상관관계 분석을 실시한 결과, 고지방식이군의 자손에서 높게 나타난 혈중 총 콜레스테롤 수치가 어미의 상대 간 절대 무게와 음의 상관관계를 ($r=-0.782$, $P=0.013$), 어미의 간 TBARS와는 양의 상관관계 ($r=0.699$, $P=0.036$)을 나타냈다. 결론적으로, 본 연구에서는 고지방 식이를 섭취한 어미에서는 임신기 대사 요구량 충족을 위한 어미의 적절한 간 증대가 일어나지 않았으며, 증가된 간 내 산화 스트레스가 수유 직후의 자손의 혈중 콜레스테롤 상승에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

주요어: 어미의 고지방 식이, 자손, 간, 임신기 간 증대, 산화 스트레스, 콜레스테롤 대사

학번: 2014-20362

목 차

국문 초록	i
목 차	iv
표 목차	vi
그림 목차	vii
약어 목록	viii
I. 서론.....	1
1. 모체 영양 환경과 자손의 대사 조절.....	1
2. 임신기 체내 대사 변화와 간 증대	3
3. 고지방식이를 섭취한 어미의 임신 및 수유기 체내 대사 변화.....	5
4. 어미의 고지방식이에 대한 자손의 체내 대사 변화.....	8
5. 연구의 목적	11
II. 연구 방법	13
1. 실험 동물 및 식이	13
2. 혈청 분석.....	14
3. 간 내 생화학 지표 분석	14
4. 간 내 담즙 분석	15
5. H&E 염색	15
6. 단백질 추출 및 Western blot.....	15
7. 간 내 총 RNA 추출 및 real-time PCR 분석	17
8. 지질 과산화 분석.....	20
9. 통계 분석.....	20
III. 결과.....	21

1. 어미 마우스의 체중 변화와 식이 섭취량	21
2. 어미 마우스의 해부 시 체중 및 기관 무게	23
3. 어미 마우스의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석	25
4. 어미 마우스의 간 내 지질 대사 관련 유전자 발현	28
5. 어미 마우스의 간 세포 증식	30
6. 어미의 지질 과산화 및 산화스트레스와 염증	34
7. 자손의 체중 및 해부 시 조직 무게	37
8. 자손의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석 및 어미 지표와의 상관관계	40
9. 자손의 간 내 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현	44
10. 자손의 간 발달	46
11. 자손의 간 내 산화스트레스 및 염증 유전자 발현	48
IV. 고찰	50
V. 요약 및 결론	57
참고 문헌	59
Abstract	66

표 목차

Table 1. Quantitative real-time PCR primer sequences	19
Table 2. Body and organ weight of dams.....	25
Table 3. Serum and hepatic biochemical parameters of dams	28
Table 4. Body and organ weight of male offspring.....	40
Table 5. Serum and hepatic biochemical parameters of male offspring.....	42

그림 목차

Figure 1. The effects of maternal high fat diet on later life disease development of their offspring.....	2
Figure 2. Body weight and food intake of dams during experimental period.....	23
Figure 3. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in lipid metabolism.....	30
Figure 4. Effects of maternal high fat diet consumption on total liver DNA and protein contents of dams.....	33
Figure 5. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic proliferation and apoptosis of dams.....	34
Figure 6. Effects of maternal high fat diet consumption on oxidative stress of dams ..	36
Figure 7. Effects of maternal high fat diet consumption on inflammation of dams.....	37
Figure 8. Body weight of male offspring during experimental period.....	39
Figure 9. H&E staining of liver tissue sections of male offspring.....	43
Figure 10. Correlation between offspring serum cholesterol level and dam biochemical parameters	44
Figure 11. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in cholesterol metabolism of male offspring.....	46
Figure 12. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic cell proliferation and apoptosis of male offspring	48
Figure 13. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA expression of anti-oxidative enzyme and inflammation of male offspring	50

약어 목록

ABCA: ATP-binding cassette sub-family A member

ABCG: ATP-binding cassette, sub-family G member

ALT: Alanine transaminase

AST: Aspartate Aminotransferase

BSEP: Bile salt export pump

CD: Cluster of differentiation

CON: Control diet group

CON-O: Offspring of control diet group

CPT: Carnitine palmitoyltransferase

CYP7A1: Cytochrome P450 7A1, Cholesterol 7 alpha-hydroxylase

FASN: Fatty acid synthase

FXR: Farnesoid X receptor

HDL-C: High density lipoprotein - cholesterol

HFD: High fat diet group

HFD-O: Offspring of high fat diet group

HMGCR: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase

HO: Heme oxygenase

HSC: 70kDa heat shock cognate protein

IL: Interleukin

LDLR: Low density lipoprotein receptor

LXR: Liver X receptor

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

RPL19: Ribosomal protein L19
SCD: Stearoyl-CoA desaturase
SR: Scavenger receptor
SREBP: Sterol regulatory element-binding protein
PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
PGC: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances
TC: Total cholesterol
TG: Triacylglycerol
TNF: Tumor necrosis factor
TLR: Toll-like receptor

I. 서론

1. 모체 영양 환경과 자손의 대사 조절

생애 초기 자손의 영양 환경을 모체가 전적으로 담당하는 시기인 임신기 및 수유기의 모체 영양상태가 자손의 성장과 발달의 주요 요인으로 알려져 있다 (Skogen and Overland, 2012). 성인기 건강과 질병의 발달 기원 이론 (Developmental origins of health and disease; DOHaD)에 따르면, 성인기 질병은 민감한 발달시기인 태아시기와 출생 후의 초기 발달과정에 의해 영향을 받을 수 있다 (Godfrey and Barker, 2001). 임신기 및 수유기의 저단백, 칼로리 제한 및 고지방 식이와 같은 부적절한 영양 환경은 자손 기관의 영구적인 결함을 일으키며, 생애 초기 대사 장애 및 질환 발생뿐만 아니라, 이후 성인기의 비만, 고혈압 및 비알코올성 지방간(Non-alcoholic fatty liver disease)와 같은 대사 질환을 쉽게 유발하는 것으로 알려져 있다 (Carone et al., 2010; Elahi et al., 2009; Gluckman et al., 2008; Li et al., 2011; Waterland and Garza, 1999; Wu et al., 2004). 특히 생애 초기는 자손의 성장 및 체내 기관, 특히 생명유지에 다양한 기능을 하는 간 발달 과정에 매우 중요한 시기로 알려져 있다. 위의 내용과 관련하여 모체의 고지방 식이 섭취와 자손의 대사 변화에 대한 간략한 도식을 Figure 1에 나타내었다 (Li et al., 2011; Williams et al., 2014).

World Health Organization(WHO)에 따르면, 2008년도 전세계 20세 이상의 성인의 35%가 과체중 이며 (체지방률 ≥ 25 kg/m²), 이는 1980년대 대비 2배 가량 증가한 수치이다. 비만 발병율 (체지방률 ≥ 30 kg/m²) 역시 남성의 10%, 여성의 14%로 과거 1980년도의 각 5%, 8% 대비 큰 폭으로 상승하였다 (WHO, 2014). 일반적으로 성인기의 고지방 식이는 비만, 대사

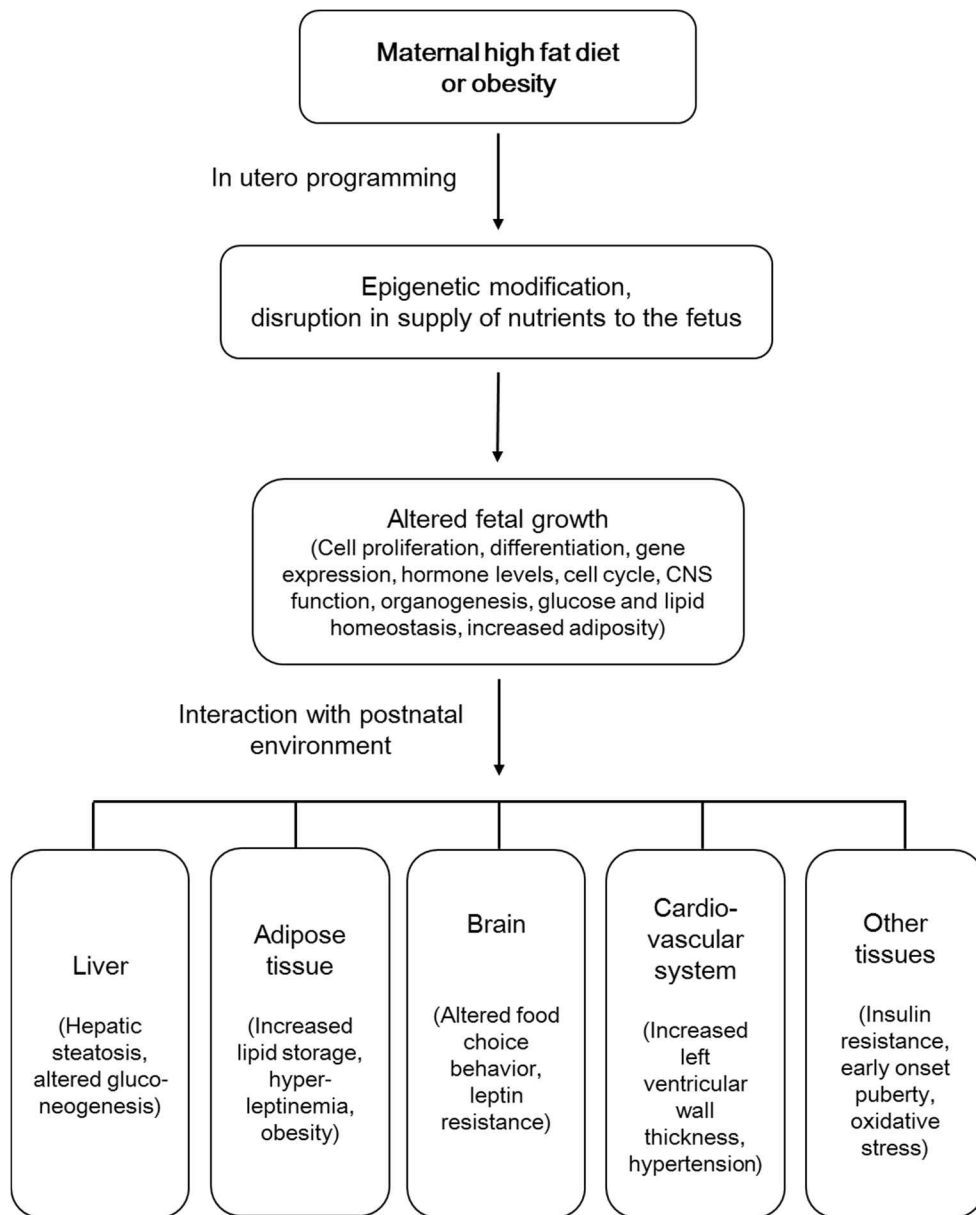


Figure 1. The effects of maternal high fat diet on later life disease development of their offspring (modified from (Li et al., 2011; Williams et al., 2014))

증후군 및 인슐린 저항증 등 성인기 질환을 유도하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 래트, 마우스 및 영장류 등 다양한 동물 실험을 통해, 자손의 생애초기 기관 발달 시기인 임신 및 수유기의 모체 식이가 자손의 생리적 기능에 미치는 영향에 대한 연구들이 다양하게 보고되고 있다. 여러 선행 연구들에서는 유전적으로 비만을 유도하거나, 약 40%–60%의 지방을 함유한 식이를 통해 고지방 식이에 따른 어미와 자손의 생리 변화를 관찰하였다. 이 식이는 WHO에서 일반적으로 사람에게 권장되는 지방 섭취량인 15%–30%를 크게 웃도는 수치로, 체내 대사를 변화시키고, 대사 질환을 유도할 것으로 생각된다 (Amine et al., 2002; Aranceta and Perez-Rodrigo, 2012).

간은 신체 내 가장 큰 기관 중 하나로, 글리코겐 전환 및 축적, 담즙 생성, 혈액 단백질 생성 및 해독작용 등 생명유지에 필요한 다양한 기능을 수행한다. 간 세포(hepatocyte)는 간 조직을 이루는 주요 세포로 배아기와 같은 생애초기에 내배엽(endoderm)으로부터 분화되어 발달하며, 이 시기에 주변 환경에 의해 매우 민감하게 발달하는 것으로 알려져 있다 (Zorn, 2008). 따라서, 고지방 식이와 같은 외부 자극으로 인해 생애 초기 간의 발달이 정상적으로 이루어지지 않게 되는 경우 대사상의 문제를 유발할 수 있다.

2. 임신기 체내 대사 변화와 간 증대

임신기 모체의 간은 태아의 성장과 태반 발달 등, 증가하는 대사 요구량을 충족시키기 위해 대사적인 변화를 수반한다 (Herrera, 2000; Zou et al., 2013). 특히 임신 중 이러한 대사 요구량을 만족시키기 위해, 모체의 간은 간세포의 크기 증가 (hypertrophy)와 그 수의 증가 (hyperplasia)를 통해 임신에 따른 대사적 적응을 한다 (Bustamante et

al., 2010; Dai et al., 2011; Zou et al., 2013). 임신기의 간은 성 호르몬인 에스트로겐과 혈청 내 담즙산 증가 등의 영향으로 그 크기가 증대되며, 세포주기 조절 인자인 p53, cyclin D1 단백질의 발현 변화 및 전사인자 Farnesoid X receptor (FXR)의 발현 감소 등을 통해 세포 상의 변화를 나타낸다 (Milona et al., 2010). 또 다른 임신기 간의 주요 특징 중 하나는, 혈청 및 간 내 콜레스테롤과 담즙 항상성의 변화이다. 태아의 간은 미성숙하여 담즙을 제거할 수 있는 능력이 없음에도 불구하고 담즙을 생성하기 때문에, 이를 제거하기 위해 태아의 담즙은 태아의 간-태반-어미 간 경로를 거쳐 모체의 간을 통해서 제거된다 (Marin et al., 2008). FXR은 담즙을 리간드로 작용하는 핵수용체로, 하위 인자인 Short heterodimer partner (SHP)의 발현을 증가시키며, 이를 통해 담즙 생성과정의 제한 효소 (rate limiting enzyme)인 Cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1)의 발현을 감소시킨다. 또한, FXR은 Bile salt export pump (BSEP)의 발현을 증가시켜, 간 내 담즙의 배출을 증가시킨다 (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000). 임신기 모체의 간에서는 태아로부터 유입된 다량의 담즙으로 인해 FXR 활성이 증가할 것으로 예상되나, 임신기 성호르몬인 에스트로겐의 증가와 에스트로겐 수용체의 증가로 인해, FXR 하위 유전자인 SHP 활성이 감소하여 마치 FXR의 활성이 감소한 듯한 procholestatic 환경을 조성한다. 이를 통해 간 내 담즙 정체성 기전이 활성화 되는 것으로 알려져 있다 (Papacleovoulou et al., 2011; Zhu et al., 2013). 임신기간 중 담즙 대사에 문제가 생길 경우 정상보다 과도한 임신기 담즙 정체성 간 질환이 유발되며, 이러한 모체 간 내 담즙의 과다 축적으로 태아에게 까지 독성 효과를 내는 것으로 알려져있다 (Williamson and Geenes, 2014). 임신기 모체 간의 정상적 발달이 저해되어 담즙산 배출능력이 손상되었다면, 자손에서 수송된 담즙이 정상적으로 배출되지

못하고, 태아의 간에 채수송 되어 그에 따른 독성 효과를 받을 것으로 생각된다.

3. 고지방식을 섭취한 어미의 임신 및 수유기 체내 대사 변화

임신 수유기의 고지방 섭취는 어미의 식이 섭취량, 체내 구성, 호르몬 및 아디포카인, 당 및 지질 대사 그리고 태반의 영양소 수용체의 변화를 수반하며, 이러한 변화들로 모체 간의 대사적 부담을 증가시킬 것으로 사료된다 (Williams et al., 2014). 최근의 선행 연구들에 따르면, 모체의 고지방 식이가 자손의 성장 및 발달에 미치는 영향 및 요인을 다양한 관점으로 보고하고 있다. 첫째로, 비만, 당뇨 및 태아발육지연 (Intrauterine growth retardation) 등 모체의 대사적 질환 및 영양상태 변화를 자손에게 영향을 미치는 중요 요인으로 보는 연구들이 있다 (Higa and Jawerbaum, 2013). 임신한 여성의 비만의 경우, 비임신 여성에 비해 더 민감하게 고인슐린혈증, 고지방혈증, 고혈압 및 염증 증가와 같은 대사 변화를 보였으며, 자손의 성인기 심혈관 질환과 상관관계가 있는 것으로 보고되었다 (Ramsay et al., 2002). 임신기 중 모체와 자손의 물질이동은 태반을 통해 이루어지며, 모체 내 영양소 농도 및 태반의 변화는 자손의 성장 및 발달에 영향을 준다 (Larque et al., 2013). 한 C57/BL6 마우스 연구에서는 임신 전 및 임신기의 고지방 식이로 인해 어미의 혈중 유리지방산 감소, 중성지방 증가와 함께 태반의 Glucose transporter 1 (GLUT1), Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2)의 단백질 발현 증가로 해당 영양소의 태반 운송량이 증가하였으며, 배아 18.5일의 자손에서 과성장이 일어남을 확인하였다 (Jones et al., 2009). 모체의 지방산은 Fatty acid transporter protein

(FATP)를 통해 태반 내로 수용되고, 태반 내에서 산화 작용, 신호 전달 및 유전체 조절과 같은 생화학적 활성을 갖거나 자손에게 전달되어 사용된다. 고지방 식이로 인해 모체 내에서 지방산의 농도가 달라지는 경우, 태반 및 영양소 농도가 변화하며, 자손의 성장 및 발달에 영향을 미칠 것으로 보고되고있다 (Cetin et al., 2012; Hernandez et al., 2012). 고지방 식이를 통한 임신기 중 영양소 변화에 대한 선행논문에서는 높은 혈중 비에스테르형 지방산, 간의 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC1), Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)의 mRNA의 증가가 관찰되었다 (Hartil et al., 2009).

둘째, 임신기 및 수유기의 모체 고지방식은 체내 호르몬의 변화를 수반한다. 비만 관련 역학 연구 및 설치류를 이용한 동물연구들에서 비만 개체들은 아디포넥틴의 감소, 렙틴의 증가 등의 변화가 관찰되며, resistin의 경우 연구간의 상이한 결과가 보고되었다 (Heerwagen et al., 2010; Mitchell et al., 2005). 아디포넥틴은 체질량 지수와 음의 상관관계를 가지며, 고지방식으로 인해 변화된 아디포넥틴은 모체의 당 신생합성 증진, 지방산 산화, 인슐린 민감도 감소, 태반에서 인슐린 신호 전달, 아미노산 수용을 변화시키며, 자손의 발달에도 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 특히 이 아디포넥틴은 어미와 자손을 연결하는 요인으로 연구되고 있으며, 모체의 경우 지방조직을 중심으로 연구되고 있다 (Aye et al., 2013).

셋째, 고지방 식이 섭취로 인한 모체의 산화스트레스 증가와 염증 환경 조성이 자손의 성장 및 발달에 영향을 미친다. 선행 연구들에 따르면, 고지방 식이를 섭취로 인해 모체 내에서 과도한 산화반응이 일어나며, 미토콘드리아 대사 저해와 항산화 능력 저해가 유발되고, 지방 독성을

보이는 것으로 보고되고있다 (Hughes and Oxford, 2014; Pruis et al., 2014; Segovia et al., 2014). 또한 모체에서는 Tumor necrosis factor α (TNF α), Interleukin-6 (IL-6), c-reactive protein 증가와 같은 pro-inflammatory 환경을 조성하는 것으로 알려져있다. 모체에서 변화된 사이토카인의 농도와 더불어 비만한 모체의 태반에서는 염증 지표인 Cluster of differentiation 14 (CD14)의 수치 상승과 지방산 증가로 인한 Toll-like receptor 4 (TLR4)의 증가로 대식세포의 침투 증가와 같은 염증반응이 크게 나타난다. 이를 통해 자손에게서 pro-inflammatory 유전자의 발현 증가, 항산화 효소 및 미토콘드리아 대사 관련 유전자의 감소, Insulin receptor substrate (IRS1)-serine 인산화를 통한 인슐린 신호 전달 저해 및 간 독성 등 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Challier et al., 2008; Higa and Jawerbaum, 2013; Zhu et al., 2010). 또한 모체의 고지방 식이가 어미에서 높은 혈중 IL-1 β , TNF α (Ashino et al., 2012), 간 내 염증 지표의 증가와 지질 축적 및 지질 대사의 변화가 보고되었으며, 이 같은 변화가 태어난 직후 자손의 염증에 영향을 줄을 확인하였다 (Li et al., 2013).

마지막으로 최근의 연구들에서는 고지방 식이로 인한 후생적 효과가 보고되고 있다. 래트의 지방조직에서 어미의 고지방 식이로 인한 식욕조절 호르몬인 렙틴 프로모터의 메틸화 패턴변화 (Milagro et al., 2009)와 마우스 난모 세포에서 PPAR α 프로모터의 DNA 메틸화에 관련된 연구 등이 보고되고 있으며, 이로 인한 자손의 간 내 DNA 메틸화 변화에 초점을 함께 두어 모체의 영양학적 연구와 유전적 변화를 통합하는 연구들이 활발히 이루어지고 있다 (Ge et al., 2014).

수유기의 모체의 체내 대사 변화 및 영양환경 변화 역시 자손의 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 수유기가 끝나는 시기까지 자손은

전적으로 모유를 통해 영양소를 섭취하므로, 이 시기 역시 임신기와 더불어 생애초기 자손의 성장 및 발달에 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다. 수유기 선행연구들에서는 고지방 식이로 인해 어미 마우스 유선의 지방합성이 감소되고, 중성지방, 지방산 및 에너지 함량 감소 등의 변화를 보고하거나(Aoki et al., 1999), 고지방 식이로 인해 모유내 지방산의 포화 비율 및 탄소수 증가, 모유당 지질 함유량 증가로 자손의 피부에서 TLR2/4-의존적 독성을 보고하였다 (Du et al., 2012). 모유 생성을 확인한 연구에서는 고지방 식이의 어미마우스에서 GLUT1, α -lactalbumin, β -casein의 mRNA 발현 감소 및 염증관련 유전자인 IL-6, TNF α 증가를 보고하였다 (Hernandez et al., 2012). 또한, 모유의 성분변화에 대한 연구에서는 생후 11, 21일의 모유 성분 분석을 통해 어미 래트(rat)의 고지방 섭취에 따른 단백질, 락토오스, 중성지방, 총 콜레스테롤의 증가를 확인하였다 (Franco et al., 2012). 이처럼 임신 및 수유기의 고지방 식이는 모체의 생화학적, 유전적 변화를 일으켜 자손의 성장 및 발달에 영향을 주며, 이에 대한 다양한 원인에 대한 연구들이 이루어지고 있다.

4. 어미의 고지방식이에 대한 자손의 체내 대사 변화

자손의 간은 태중 및 수유기와 같은 특정 시기에 빠른 발달이 일어나며, 수유기 전후로 발달 및 성장이 완료된다. 이러한 생애 초기의 간 발달은 영양상태에 따라 큰 영향을 받으며, 이 영향으로 변화된 간 발달 상태 및 기능적인 대사 변화가 이후 성인기 자손의 대사 및 질환 발병에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Waterland and Garza, 1999). 마우스의 경우 3주간의 임신기간 중 배아 9일 (embryonic day 9) 시기에 간의 개체 발생이 시작 되며, 약 배아 10.5일 에서 12.5일 정도에 주요 조혈 형성 기능이 완료되고, 배아 14.5일 정도 간 세포와 담즙 관의 세포 형성이

일어난다. 이 시기를 거치며 자손의 간은 점차 주요한 대사기능을 수행하는 성숙한 간으로 발달하는데, 이 발달 과정 중 어미의 고지방 식이와 같은 환경적 자극으로 발달이 지연되거나 부적절하게 이루어지는 경우 성인기 대사 질환에 노출되기 쉬울 것으로 보고된다 (Hata et al., 2007; Li et al., 2009; Peng et al., 2012; Renaud et al., 2014).

모체 고지방식으로 인한 자손의 대사 변화에 관한 선행논문들은 다양한 시기와 관점으로 자손의 대사 변화를 설명하고 있다. 임신기 및 수유기동안 고지방식을 섭취한 래트에서는 생후 2일인 자손의 간에서 세포 주기 저해인자인 Cdk1a의 증가로 인한 G0/G1기 세포 주기 정지 비율의 증가를 확인하였고, 수유 종료 후인 생후 27일에서는 이 같은 세포 주기 저해 요소가 나타나지 않음을 확인하였다 (Dudley et al., 2011). β -catenin은 세포막에 E-cadherin과 복합체를 이루어 존재하며 세포 증식, 분화 및 배아기 간 발달 등 세포의 분열시기에 활성화 되는 것으로 알려져 있다 (Apte et al., 2007). 초기 간 발달에 중요한 역할을 하는 이 Wnt/ β -catenin 신호 경로에 대한 한 선행연구에서는, 수유기 중간 시기인 생후 7일의 자손에서 고지방 식이 자손군이 유의적으로 β -catenin의 단백질 발현 양이 낮음을 보여 간발달이 저해되었음을 확인하였고, 이것을 Wnt1의 histone modification에 의해 나타난 간 발달 저해로 설명하였다 (Yang et al., 2012). 어미의 과체중 유도 후의 임신 연구에서는 수유 종료 직후 시점인 생후 21일에서 과체중 자손군의 인슐린 및 아디포넥틴 신호 전달 변화와 지질 대사 변화를 통해 자손의 에너지 균형 조절에 영향을 미친 것을 관찰하였다. 이 연구에서는 식이의 기간이나 조성보다 어미의 과체중 표현형 자체가 자손에게 미치는 영향을 규명하는데 초점을 두었다 (Gaccioli et al., 2013). 그 밖의 연구에서는 어미 고지방 식이 섭취군 생후 1일, 10일 자손에서 모두 산화스트레스 증가와 간 지방증을 확인하였고

(Brighenti et al., 2015), 생후 14일의 자손에서 어미의 고지방식이에 의한 성별간 콜레스테롤 대사 이상을 확인하고 그 기전을 밝혔다 (Mischke et al., 2013). 생후 21일 자손의 연구에서는 어미의 고지방식으로 인해 자손의 간 내 PPAR mRNA 발현 변화와 간 내 당, 지질 대사 변화를 관찰하였으며, 고지방 식이 자손군에서 출생 직후 낮은 체중과 수유 종료 직후 높은 체중으로 역전된 결과를 통해 고지방 식이 자손군의 회복 성장(catch-up growth)의 가능성을 제시하였다 (Zheng et al., 2014).

고지방 식이를 섭취한 자손의 성인기 질환 발병에 관한 연구는 수유 후 식이 조성과 기간에 따라 더욱 다양하게 이루어지고 있다. 어미 쥐의 비만에 관한 한 마우스 연구에서는 고지방 식이를 섭취한 어미군의 8주령 자손 마우스에서 산화스트레스 증가와 지질 대사의 변화 및 미토콘드리아 대사 기능의 문제로 인한 지방간 발병을 보고하였다 (Alfaradhi et al., 2014). 미토콘드리아는 모계 유전되므로, 어미 난포에서 PGC1 α 의 변화와 같은 미토콘드리아 대사 및 활성 산소 중 증가의 문제가 나타날 경우, 자손에게 직접적인 영향을 줄 것으로 생각된다. 자손의 성인기 비알코올성 지방간염 (Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH) 유발을 확인한 논문에서는 고지방 식이 어미 군의 자손이 수유 후 지속적으로 고지방식이를 섭취하였을 때, 어미가 임신 및 수유기에 혹은 자손이 수유기 이후에서만 고지방 섭취를 한 군에 비하여 NASH의 유발이 유의적으로 많이 나타났고, 이를 간 내 미토콘드리아 대사 이상과 간 내 지질 축적 관련 유전자의 증가에 의한 영향으로 설명하였다 (Bruce et al., 2009). 이처럼 어미의 고지방식이의 영향을 받은 자손에 관한 연구들은 자손을 다양한 시기, 기관, 원인으로 분석하고 있으며, 이에 대한 다양한 해석들을 보고하고있다. 그러나 선행연구들에서는 동일한 어미의 고지방 식이 연구임에도 불구하고, 연구 간의 상이한 결과들로 고지방 식이에 의한

영향을 명확히 규정짓는데 어려움이 있다. 측정 지표 중 출생 직후 체중의 경우, 군간의 유의적인 차이를 나타내지 않거나 (Brighenti et al., 2015; Li et al., 2012; Tamashiro et al., 2009; Yang et al., 2012), 고지방 식이 섭취 자손에서 더 낮은 출생 체중 (Zheng et al., 2014) 혹은 반대로 높은 출생 체중을 보고한 연구와 같이 (Mischke et al., 2013) 일관되지 못한 결과들을 보고하고 있다. 자손의 혈중 지질 농도 역시, 중성지방과 콜레스테롤이 고지방 식이 자손군에서 높은 경우와 (Mischke et al., 2013), 군간의 차이가 나타나지 않거나 (Yang et al., 2012) 혹은 콜레스테롤에서만 고지방 식이군이 높게 나타나는 등 (Zheng et al., 2014), 희생 시기와 어미 식이의 지방 함유량에 따라 상이한 결과들을 보이고 있다. 고지방 식이를 섭취한 어미의 연구에도 역시 희생시 체중에서 유의적인 차이가 있거나 (Cannon et al., 2014) 혹은 동일한 경우 (Shankar et al., 2010), 간 조직 상대 무게가 비만 어미군의 무게가 더 나가거나 (Shankar et al., 2010), 혹은 그 반대의 경우 (Mischke et al., 2013)로 나타나는 등 연구간 상이한 결과를 나타낸다는 한계점이 있다.

5. 연구의 목적

모체의 식이 구성과 섭취는 자손의 성장 및 다양한 조직의 기능적 발달에 장기적 영향을 미치며, 자손의 항상성 조절 메커니즘 관련 유전자의 발현까지 영향을 줄 것으로 생각되고 있다 (Cannon et al., 2014; Williams et al., 2014). 근래의 여러 선행논문들에서 어미의 과영양상태와 자손의 당 대사 및 지질 대사 이상, 비만 등 대사 질환에 영향을 주는 것으로 보이고 있으나, 각 연구에서 식이 섭취기간과 식이 내 지방 함유량에 따라 상이한 연구 결과를 나타낸다는 한계점을 나타내고 있다 (Cianfarani et al., 2012; Heerwagen et al., 2010). 또한, 선행 연구에서 고지방 식이 섭취로 변하는

것으로 알려진 어미의 지질 대사, 세포 주기 및 증식, 산화 스트레스, 염증 대사와 자손과의 상관관계에 대한 이해 역시 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 어미의 고지방 식이 섭취로 인한 어미와 자손의 생화학적 지표 및 간 내 유전자 변화를 지질 대사, 세포 주기 및 증식, 산화 스트레스, 염증 대사 중심으로 분석하고, 어미와 자손의 대사 변화간 상관관계 분석을 통해 세대간 영향을 확인하고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 실험 동물 및 식이

오리엔트바이오 사(대한민국)에서 구매한 약 14 g의 4주령의 암컷 C57Bl/6 마우스를 실험 군 당 4마리씩 4개 케이지로 분리해 사육하였다. 동물 사육은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암 주기(7:00 AM-7:00PM)의 환경에서 진행되었다. 모든 동물은 식이와 물을 자유 급여법으로 제공받았으며, 1주간 일반 사료 (normal chow diet)로 적응기간을 가졌다. 적응기간 후 5주령의 암컷 마우스는 임의로 대조 식이군 (Control diet group, CON)과 고지방 식이군 (High fat diet group, HFD)의 2개 군으로 나누어 각각 대조 식이(#D12450B, Research diets Inc., 총 에너지 중 10% 지방, 20% 단백질, 70% 탄수화물; 총 에너지 3.85 kcal/g) 혹은 고지방 식이 (#D12451, Research diets Inc., 총 에너지 중 45% 지방, 20% 단백질, 35% 탄수화물; 총 에너지 4.73 kcal/g)를 제공받았다. 3주간의 식이 섭취 후, 각 2마리 암컷 마우스는 8주령의 수컷 마우스와 한 케이지에서 5일간 교배를 실시하였다. 임신한 마우스들은 교배 실시 16일 후, 개별 케이지로 옮겨 사육되었으며, 출산 후 3일에 자손수로 인해 발생하는 오차를 방지하기 위해 모든 어미당 자손수를 6마리로 조정하였다. 모든 어미의 식이는 임신 전, 임신기, 수유기 모두 동일하게 유지되었으며, 실험기간동안 어미의 식이 섭취량은 일주일에 3회 측정하였고, 어미와 자손의 체중은 주 1회 측정하였다. 모든 어미와 수컷 자손은 자손의 수유기가 끝나는 생후 21일에 희생하였다.

희생 시점에서 모든 마우스는 14시간 금식 후, 30 mg/kg 졸레틸 50 (Virbac, 프랑스)과 10 mg/kg xylazine (럼폰; 바이엘 코리아, 대한민국) 혼합액을 복강 투여하여 마취하였다. 혈액은 심장채혈을 통해 수집하였고,

20분간, 3000 rpm, 4℃에서 원심분리를 통해 상층액을 분리하여 혈청을 얻었으며, 실험 시까지 -80℃에 보관하였다. 모든 조직은 적출 후 phosphate-buffered saline (PBS)에 세척하여 무게를 측정하였고, 액체 질소로 즉각 동결 후 -80℃ 냉동 보관하였다. 간 조직 일부는 10% neutral buffered formalin에서 고정하여 간 조직 염색에 이용하였다.

연구에 사용된 모든 동물 실험은 서울대학교 동물실험윤리 위원회 규정에 따라 진행되었다. (승인번호: SNU-140807-1-3)

2. 혈청 분석

혈당, 중성지방, 총 콜레스테롤, 고밀도 지질단백질 콜레스테롤(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C), Alanine transaminase(ALT), Aspartate aminotransferase(AST)은 각각 효소법을 이용한 분석 시약(아산 제약, 대한민국)을 사용하여 측정하였다. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)은 Quantikine® 마우스 MCP-1 면역 분석 시약(R&D Systems, 미국)을 사용하여 sandwich enzyme linked immunosorbent assays (sandwich ELISA) 방법으로 측정하였다. 모든 흡광도는 분광 광도계 (SpectraMax® 190, molecular Devices, 미국)를 이용하여 측정하였다.

3. 간 내 생화학 지표 분석

간 내 지질은 Folch 등 (Folch et al., 1957)의 방법에 따라 측정하였다. 약 25 mg 의 간 조직을 500 µL PBS에 담가 조직 분쇄기 (Tissue Lyser system, Qiagen, 미국)와 5 mm sterile stainless steel beads를 이용하여 균질화 하였다. 모든 균질화 용액 내 단백질을 Brad-ford 단백질 분석

시약 (Bio-Rad, 미국)을 이용해 측정 한 후, 0.3 mg/300 μ L로 농도를 조정하여 800 μ L의 chloroform과 400 μ L의 methanol (2:1, v:v)을 넣고, 16시간동안 4℃에서 반응시켰다. 그 후 240 μ L의 0.88% KCl을 넣어 15분간, 1,000 \times g, 4℃에서 원심분리를 한 후, chloroform 하층액을 새 튜브에 옮겼다. 튜브 내의 용매를 모두 건조시킨 후, 건조된 지질을 완충용액 (중성지방; N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-amioethane sulfonic acid, 콜레스테롤; Phenol)을 이용해 녹인 후, 각각 혈청 분석에서 사용한 중성지방과 총 콜레스테롤 분석 시약을 사용해 흡광도를 측정하였다. 간 내 총 DNA 는 DNeasy 혈액 & 조직 분석 시약 (Qiagen, 미국)를 이용하여 측정하였다.

4. 간 내 담즙 분석

간 내 담즙 추출을 위해서 간 조직을 75% ethanol에 조직 분쇄기를 사용하여 균질화 하였고, 50℃에서 2시간동안 가온하여, 10,000 rpm, 10분, 4℃에서 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 새 튜브에 옮긴 후, 총 담즙 분석 시약 (Bioquant, 미국)을 이용하여 측정하였다.

5. H&E 염색

Formalin에 고정된 간을 파라핀 블록으로 만들어 5-10 mm 절편으로 자르고 파라핀을 제거하였다. 이 샘플을 슬라이드에 부착한 후, 간 내 지방구 확인을 위한 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였다.

6. 단백질 추출 및 Western blot

약 25 mg의 간 조직에 500 μ L의 단백질 용해 용액 [Protein lysis buffer;

50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 2.5 mM EGTA (pH 8.0), 1 mM NaF, 10 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, 1% NP-40, 10% glycerol, Protease inhibitor cocktail (Sigma, 미국)]을 넣어 조직 분쇄기를 이용하여 균질화하였다. 균질화 된 용액은 30분간, $10,000 \times g$, 4°C 에서 원심분리하여, 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 보관하였다. 각 샘플의 단백질 농도는 Brad-ford 단백질 분석 시약 (Bio-Rad, 미국)을 이용하여 측정하였다.

각 30 μg 의 단백질 샘플들을 polyacrylamide gel에서 전기영동을 통해 분자량에 따라 분리하여, semi-dry electro-transferring unit (Bio-Rad, 미국)을 이용하여 15 V에서 60분간 Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 이동시킨 후 Western blot에 사용하였다. TTBS (Tris-buffered saline solution containing 0.1% Tween-20, pH7.5) 에 5% 탈지분유를 첨가한 용액으로 PVDF membrane을 blocking 후, 측정하고자 하는 1차 항체를 TTBS에 5% 탈지분유를 첨가한 용액에 특정 배수로 희석하여 반응시켰다. 1차 항체 제거 후 TTBS 용액으로 10분간 세 번씩 세척 후, 2차 항체 (anti-mouse or anti-rabbit IgG-peroxidase-conjugated secondary antibody)로 반응시켰다. 항체가 결합된 단백질은 화학 발광법 (chemiluminescent)을 이용하여 horseradish peroxidase substrate (Millipore, 미국)로 발광시킨 후, X-ray 필름 (FUJI, 일본)에 노출해 그 밴드를 얻었다. 각 밴드의 두께는 Quantity One 프로그램 (Bio-Rad)을 통해 정량 하였다. 실험에 사용된 1차 항체는 다음과 같다: anti- 70kDa heat shock cognate protein (Hsc70; #sc-7298, Santa Cruz Biotechnology, 미국), proliferating cell nuclear antigen (PCNA, #sc-56, Santa Cruz Biotechnology), β -catenin (#sc-7199, Santa Cruz Biotechnology), cleaved caspase-3 (#9664, Cell signaling, 미국).

모든 실험에서 각 단백질 양을 보정하기 위해 HSC70이 사용되었다.

7. 간 내 총 RNA 추출 및 real-time PCR 분석

간 내 RNA는 RNAiso Plus (Takara Bio Inc., 일본)와 조직 분쇄기 (Qiagen, 미국), 5 mm sterile stainless steel beads를 이용해 균질화 하였다. 균질화 용액을 상온에 5분 방치 후, 100 μ L의 chloroform을 넣은 후 흔들어 상온에 3분간 다시 방치하였다. 15분간, 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 상층액을 분리하고, isopropanol을 첨가하여 상온 10분 방치 후, 다시 10분간, 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 500 μ L의 75% ethanol을 넣어 15분간, 7,500 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리 하여 정제된 RNA 침전물을 얻었다. 이를 diethylpyrocarbonate (DEPC) water에 녹인 후 농도와 260/280nm 흡광도 비율로 순도를 측정하였다.

cDNA는 Superscript[®] II 역전사 효소 (Invitrogen, 미국)와 2 μ g의 RNA를 사용하여 제조하였다. StepOne[™] Real Time PCR 기기 (Applied Biosystems, 미국)를 이용하여, 정량적 real-time PCR을 통해 간 내 cDNA 발현 수준을 측정하였다. 실험은 SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystem, 미국) 시약을 사용하여, 30초동안 95 $^{\circ}$ C 변성 전 과정 (predenaturation), 15초 간 95 $^{\circ}$ C에서 변성(denaturation), 1분간 60 $^{\circ}$ C에서 프라이머와 결합 (annealing) 그리고 증폭 (extension) 과정을 40회 반복하였다. 상대적 발현량은 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법을 이용하여 계산하였으며 연구에 사용된 프라이머의 서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Quantitative real-time PCR primer sequences

Gene	Forward (5'-3')	Reverse(5'-3')
ABCA1	CCCAGAGCAAAAAGCGACTC	GGTCATCATCACTTTGGTCCTTG
ABCG5	AATGCTGTGAATCTGTTTCCCA	CCACTTATGATACAGGCCATCCT
ABCG8	TCCATCCTCGGAGACACGAT	GCTGATGCCGATGACAATGA
CD36	TCCTCTGACATTTGCAGGTCTATC	AAAGGCATTGGCTGGAAGAA
CD68	GCACAGCCAGCCCTACGA	GAGCTGGTGTGAACTGTGACATT
CPT1a	ACGGAGTCCTGCAACTTTGT	GTACAGGTGCTGGTGCTTTTC
CYP7A1	AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA	GTCCGGATATTCAAGGATGCA
FASN	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT	GGGTAATCCATAGAGCCCAG
FXR	TCCGGACATTCAACCATCAC	TCACTGCACATCCCAGATCTC
HMGCR	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	AGCCGAAGCAGCACATGAT
HO-1	CCTCACTGGCAGGAAATCATC	CCTCGTGGAGACGCTTTACATA
LDLR	TGGCCATCTATGAGGACAAA	GTGTGACCTTGTGGAACAGG
LXR α	AGGAGTGTGACTTCGCAAA	CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT
MCP-1	CCAGCACCAGCACCAGCCAA	TGGGGCGTTAACTGCATCTGGC
SCD1	ATCTCCAGTTCTTACACGACCACC	CGTCTTCACCTTCTCTCGTTCATT
SR-A	TTGCTCTCTACCTCCTTGTGTTTG	CCATAGGACCTTGAGATGTGTCACT
SR-B1	CCTTCAATGACAACGACACCG	CCATGCGACTTGTGAGGCT
SREBP-2	GCGTTCTGGAGACCATGGA	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA
PPAR α	CCTCAGGGTACCACTACGGAGT	GCCGAATAGTTCGCCGAA

PPAR γ	TGCACTGCCTATGAGCACTT	TGATGTCAAAGGAATGCGAG
p40phox	CCTGCCCACATTGCCAGCCA	AGACCGGCAGGCTCAGGAGG
TNF α	GGCTACAGGCTTGTCACCTCGA	CACGCTCTTCTGTCTACTGAA
RPL19	TCAGGCTACAGAAGAGGCTTGC	ATCAGCCCATCCTTGATCAGC

ATP-binding cassette sub-family A member 1 (ABCA1), ATP-binding cassette sub-family G member 5 (ABCG5), ATP-binding cassette sub-family G member 8 (ABCG8), cluster of differentiation 36 (CD36), cluster of differentiation 68 (CD68), carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1a), cytochrome P450 7A1 (CYP7A1), fatty acid synthase (FASN), farnesoid X receptor (FXR), 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR), heme oxygenase 1 (HO-1), low density lipoprotein receptor (LDLR), liver X receptor α (LXR α), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1), scavenger receptor A (SR-A), scavenger receptor B1 (SR-B1), sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), tumor necrosis factor α (TNF α), ribosomal protein L19 (RPL19)

8. 지질 과산화 분석

간 지질 과산화 정도를 측정하기 위해 TBARS를 Ohkawa 등 (Ohkawa et al., 1979)의 방법으로 측정하였다. 25 mg의 간 조직에 500 μ L의 균질 완충용액 [Homogenizing buffer; 154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 7.4)]을 넣어 조직 분쇄기를 이용하여 균질화한 후, 10분간, $600 \times g$, 4°C에서 원심분리하여 상층액만 새 튜브에 분리하였다. 상층액에 8.1% SDS, 10 % acetic acid, 0.8% thiobarbituric acid (TBA)를 첨가한 후 이를 95°C에서 가온하여 반응을 진행하였고, 1시간 후 반응을 종료하기 위해 빠르게 얼음 위에서 식혔다. 1-butanol:pyridine 혼합액 (15:1, v/v)을 샘플에 첨가하여 강하게 섞어준 후 20분간, 4000 rpm, 4°C에서 원심분리하여 붉은 상층액을 얻었고, 532 nm에서 흡광 광도계 (SpectraMax® 190, molecular Devices, 미국)로 흡광도를 측정하였다. TBARS 농도는 1,1,3,3-tetraethoxypropane 용액을 표준용액으로 사용하여 계산하였으며, 단위는 malondialdehyde/mg protein 양으로 표기하였다. 혈청 TBARS의 경우 간 TBARS에서 상층액을 얻은 후 과정과 동일하게 진행하였다.

9. 통계 분석

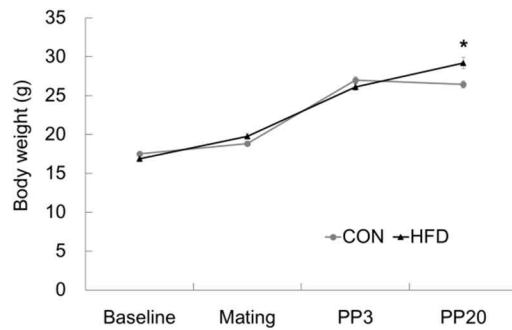
모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)으로 나타냈으며, 군간 비교분석은 t-test를 통해, 유의수준 $P < 0.05$ 에서 검증하였다. 두 변수간의 상관관계는 피어슨 상관계수 (Pearson correlation coefficient)로 나타내었다. 분석은 SPSS ver.22 (IBM SPSS, 미국)을 통해 실시하였다.

Ⅲ. 결과

1. 어미 마우스의 체중 변화와 식이 섭취량

실험기간동안 어미 마우스의 체중 변화는 다음과 같다. 실험식이 시작 시, 수컷과 교배 시, 출산 후 3 일에는 군간의 유의적인 체중 차이가 나타나지 않았고, 실험 종료 시인 출산 후 20 일의 금식 전 체중에서 유의적으로 고지방 식이 어미군이 대조 식이 어미군에 비해 높은 체중을 보였다 (Figure 2 (A)). 식이 섭취량은 임신 준비기, 임신기, 수유기로 나뉘며, 개체당 하루 식이 섭취량을 gram 과 kcal 로 표시하였다. 임신기와 수유기동안의 식이 섭취량의 gram 수는 고지방 식이 어미군에서 유의적으로 낮았으나, 임신 준비기, 임신기, 수유기동안 식이로 섭취한 총 에너지량은 고지방 식이 어미군에서 모두 유의적으로 높았다 (Figure 2 (B)).

(A)



(B)

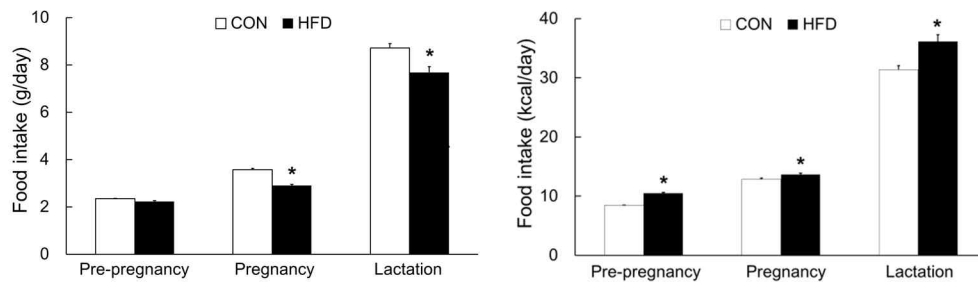


Figure 2. Body weight and food intake of dams during experimental period

(A) Body weight of dams at baseline, mating, after delivery (PP3) and weaning (PP20) and (B) food intake (gram/day or kcal/day) of dams during pre-pregnancy, pregnancy and lactation. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

PP; Postpartum day, CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

2. 어미 마우스의 해부 시 체중 및 기관 무게

어미 마우스의 해부 시 체중과 지방조직의 절대 무게 및 체중 상대 무게가 고지방 식이 어미군에서 대조 식이 어미군에 비해 유의적으로 높았다. 본 실험에서는 기관의 무게 중 특이적으로, 대조 식이 어미군의 간 무게 및 체중 상대 무게가 고지방 식이 어미군보다 유의적으로 높게 나타났다 (Table 2).

Table 2. Body and organ weight of dams

Group	CON (n = 7)	HFD (n = 5)
Final body weight (g)	23.09 ± 0.44	26.32 ± 0.62 *
Organ weight (g)		
Liver	1.73 ± 0.04	1.29 ± 0.05 *
Adipose tissue‡	0.15 ± 0.02	0.39 ± 0.04 *
Relative organ weight (% of body weight)		
Liver	7.48 ± 0.16	4.90 ± 0.08 *
Adipose tissue‡	0.65 ± 0.07	1.48 ± 0.14 *

Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

‡The sum of retroperitoneal and perirenal fat

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

3. 어미 마우스의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석

어미 마우스의 혈청 분석결과, 혈당, 고밀도 지질단백질 콜레스테롤 (High density lipoprotein- cholesterol, HDL-C), 고밀도 지질단백질 콜레스테롤 대비 총 콜레스테롤 비율 (Total Cholesterol/HDL-C), 간 내 손상도와 관련된 ALT와 AST는 고지방 식이에 의한 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 혈청 분석에서는 지질 지표 중 고밀도 지질단백질 콜레스테롤과 심혈관 질환과 관련된 TC/HDL-C 비율을 제외한 중성지방과 총 콜레스테롤에서 고지방 식이 어미군이 대조 식이 어미군에 비해 유의적으로 높은 수치를 보였다 (Table 3). 혈청 분석결과를 통해 어미 마우스의 지질 대사 조절에 문제가 있는 것으로 사료되며, 이와 관련하여 간에서의 대사적 변화가 있을 것으로 생각되었다.

고지방 식이군 어미 마우스의 낮은 간 무게와 관련하여, 지질 축적이 영향을 있는 지와 어미의 간 내 지질 대사의 문제가 있는지를 확인하기 위해, 간 내 지질 축적 정도를 측정한 결과는 다음과 같다. 간 내 중성지방 함량은 간 단백질로 보정하였을 때, 고지방 식이 어미군이 대조 식이 어미군보다 유의적으로 높았고, 콜레스테롤 함량은 유의적으로 낮게 나타났으며 (Table 3), g당 간 무게 보정에서도 위와 동일한 결과를 보였다 (중성지방; 대조 식이 어미군, 39.7 ± 1.4 mg/g liver, 고지방 식이 어미군, 53.8 ± 1.2 mg/g liver, $P < 0.05$, 콜레스테롤; 대조 식이 어미군, 2.62 ± 0.9 mg/g liver, 고지방 식이 어미군, 1.03 ± 0.11 mg/g liver, $P < 0.05$).

임신기 간 내 담즙은 임신기간 중 태아에서 배출하지 못한 담즙을 어미에게 이동시켜 배출 및 축적하는 것으로 알려져 있다. 이와 관련하여 본 실험에서 간 내 담즙은 간의 크기 증가와의 체내 독성의 가능성을 확인하기 위해 측정 하였으나, 식이에 따른 군간의 차이는 나타나지 않았다 (Table 3).

종합적으로 간 조직 내 중성지방, 콜레스테롤 및 담즙의 축적량을 확인하였을 때, 이 축적량이 어미 마우스의 간에서 군간의 유의적인 무게차이를 나타내는 요인은 아닐 것으로 생각되나, 혈청 및 간 내 중성지방과 콜레스테롤의 유의적인 차이를 통해 어미에게 지질 대사상의 변화가 일어난 것으로 사료되었다.

Table 3. Serum and hepatic biochemical parameters of dams

Group	CON (n=7)	HFD (n=5)
Serum		
Glucose (mg/dL)	126.3 ± 17.0	170.1 ± 18.4
TG (mg/dL)	25.9 ± 2.6	40.0 ± 4.5 *
TC (mg/dL)	78.8 ± 6.2	112.9 ± 11.3 *
HDL-C (mg/dL)	45.2 ± 2.8	64.0 ± 8.7
TC/HDL-C ratio	1.78 ± 0.17	1.82 ± 0.11
Protein (mg/dL)	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1
ALT (IU/L)	6.4 ± 0.8	6.20 ± 1.2
AST (IU/L)	46.6 ± 2.2	46.8 ± 7.7
Liver		
TG (µg/mg protein)	217.3 ± 7.2	271.7 ± 7.4 *
Cholesterol (µg/mg protein)	14.4 ± 0.9	5.2 ± 0.6 *
Total bile acids (µmol/g)	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.03

Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

ALT; Alanine transaminase, AST; Aspartate aminotransferase, CON; Control diet group, TG; Triacylglycerol, TC; Total cholesterol, HDL-C; High density lipoprotein-cholesterol, HFD; High fat diet group

4. 어미 마우스의 간 내 지질 대사 관련 유전자 발현

앞선 결과를 통해 고지방 식이를 섭취한 어미 마우스의 혈중, 간 내 지질 변화를 관찰하였고, 이에 따른 간 내 대사 기전의 변화를 확인하기 위해 mRNA 수준에서 중성지방 대사, 콜레스테롤 대사 및 지단백질 수송 관련 지표를 측정하였다. 중성지방 대사에서는 지질 및 지단백질 대사와 관련된 PPAR α , 지방조직의 생성, 세포 분화 및 인슐린 신호 전달과 관련된 PPAR γ 와 같은 주요 전사인자의 유전자 발현 차이가 나타나지 않았고, 지방산 합성 효소인 Fatty acid synthase (FASN), 지방산의 β -산화 관련 효소인 Carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a)의 유전자 발현에서도 역시 유의미한 군간의 차이를 나타내지 않았다. 단일 불포화 지방 합성 효소인 Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)의 유전자 발현에서만 고지방 식이를 섭취한 어미군에서 유의적으로 낮은 수치를 보였는데, 이는 초저밀도 지질단백질 (Very low-density lipoprotein, VLDL)의 포화지방산의 간 내 축적을 증가시켜 대사상의 문제를 나타낼 것으로 사료된다 (Figure 3). 콜레스테롤 대사 관련 유전자는 전사인자 수준에서 FXR, SREBP-2, LXR과 그 하위 유전자 중 지단백질 수용체인 LDLR과 스테롤 수송체인 ATP-binding cassette, sub-family G member 8 (ABCG8)의 유전자 발현이 고지방 식이 어미군에서 유의적으로 높게 나타났다. 그 밖의 콜레스테롤 생합성의 제한 효소인 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMGCR)와 담즙 생성의 제한 효소인 Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1)의 유전자 발현은 군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Figure 3). 따라서 고지방 식이 어미군에서 나타나는 높은 혈중 콜레스테롤 및 낮은 간 내 콜레스테롤은 콜레스테롤의 생합성보다 간 내 운송 유전체의 변화로 인한 현상으로 사료된다.

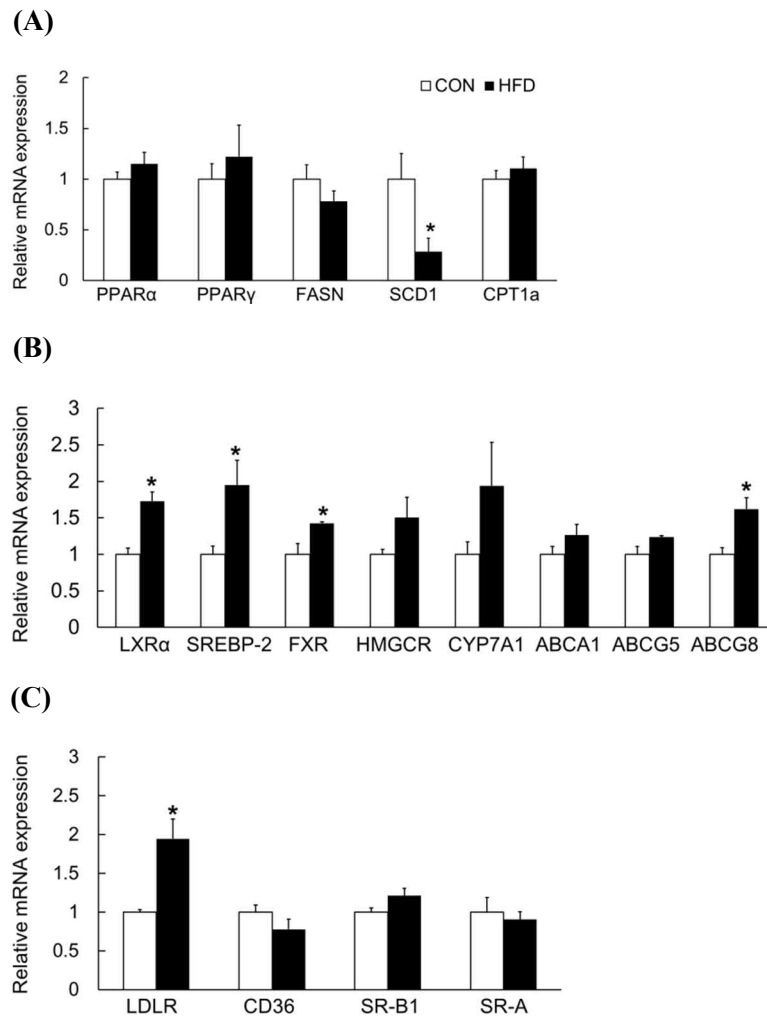


Figure 3. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in lipid metabolism.

Expression of genes involved in (A) triacylglycerol metabolism, (B) cholesterol metabolism and (C) lipoprotein transport. Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

5. 어미 마우스의 간 세포 증식

군간의 간 무게 차이를 규명하기 위해 간 조직의 세포 증식을 실험적으로 확인해 보았다. 임신기에는 늘어나는 대사요구량을 충족하기 위해 간에서 과증식(hyperplasia)과 비대(hypertrophy)가 일어나며 간 내 총 DNA 함량 및 총 단백질 함량이 증가하고, 수유기에는 증식 없이 그 크기가 유지된다 (Bustamante et al., 2010; Zou et al., 2013). 간 세포 증가는 간 내 총 DNA 양과 비례하며, 간 조직 g당 간세포의 조밀도가 늘어나는 것이 아닌 세포 수 증가로 전체 간 조직의 크기가 커지며 대사적 기능을 담당하는 세포수가 증가한다. 따라서 간 조직 g당 DNA 함량이 아닌 간 내 총 DNA 함량이 중요한 의미를 가진다. 또한, 간 내 총 단백질의 경우 간 내 지질 축적 등이 아닌, 대사적 활동이 가능한 세포 및 효소 등에 의해 증가한다. 따라서 본 실험에서는 고지방 식이의 어미에서 임신기의 간 증대의 저해가 일어났는가를 확인하기 위해 간 조직 내 총 DNA 함량과 총 단백질 함량을 측정하였다. 실험 결과 고지방 식이 어미군에서 대조 식이 어미군에 비해 총 DNA 양과 단백질 양 모두 유의적으로 낮은 결과를 보였다 (Figure 4). 이를 통해 임신기에 일어나야 할 증가한 대사 요구 충족을 위한 간 증대가 고지방 식이를 섭취한 어미 군에서는 정상적으로 나타나지 않은 것으로 사료되며, 이 때문에 군간의 간 조직 무게 및 체중 대비 상대 무게의 차이를 나타낸 것으로 보인다.

고지방 식이 어미 군에서 임신기의 정상적인 간 증대가 일어나지 않아, 이로 인한 수유기의 회복 성장(catch-up growth)이 일어났는지 확인하기 위해, 수유기 직후 어미의 간 내 세포 증식 (proliferation) 지표인 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)와 세포 사멸 (apoptosis) 지표로 세포 사멸 관련 효소인 caspase-3의 활성 절단형인 cleaved caspase-3 단백질을 Western blot으로 측정하였다. 측정결과, 고지방

식이 어미군에서 PCNA와 cleaved caspase-3 단백질 발현량 모두 군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Figure 5). 따라서, 낮은 간 조직 무게를 보인 고지방 식이를 섭취한 어미는 임신기의 간의 정상적인 간 증대가 충분히 일어나지 않았으며, 수유기의 간에서 회복 성장 역시 나타나지 않은 것으로 사료된다.

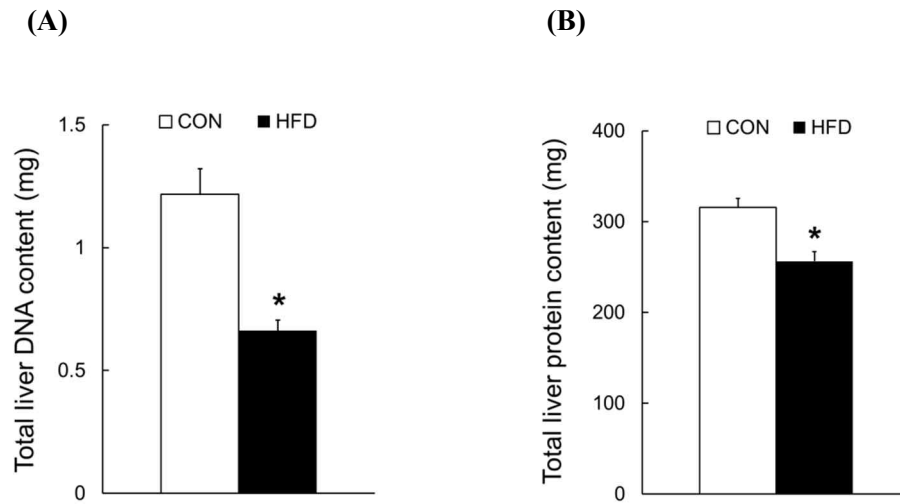


Figure 4. Effects of maternal high fat diet consumption on total liver DNA and protein contents of dams

Hepatic (A) total liver DNA content and (B) total protein content. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P<0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

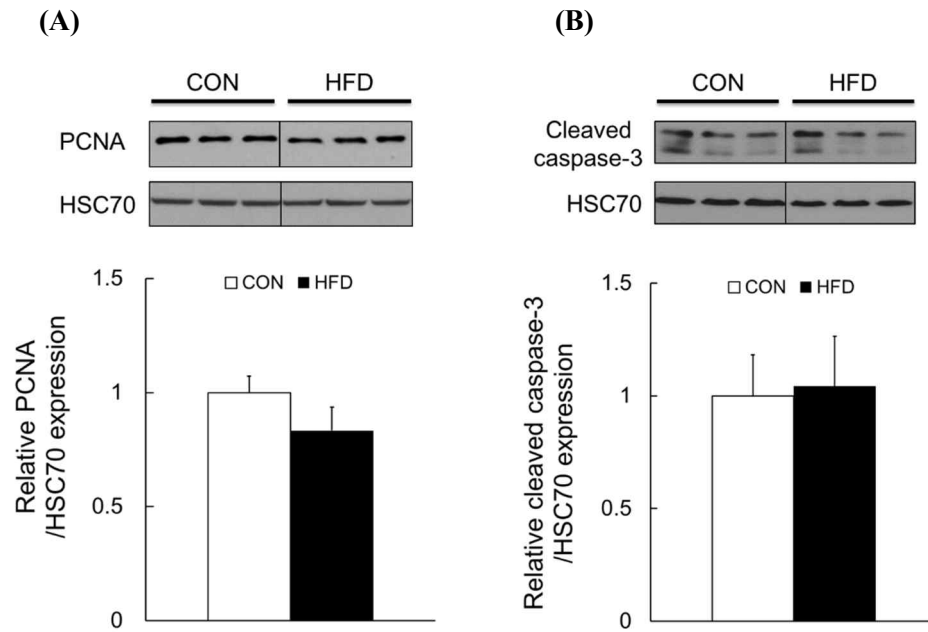


Figure 5. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic proliferation and apoptosis of dams.

Hepatic (A) PCNA and (B) cleaved caspase-3 protein of dam. The protein levels was analyzed by western blot and normalized to 70kDa heat shock cognate protein (HSC70). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

PCNA; Proliferating cell nuclear antigen, CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

6. 어미의 지질 과산화 및 산화스트레스와 염증

고지방 식이에 의한 고콜레스테롤혈증은 동물 모델에서 간 내 염증 반응의 위험인자로 알려져 있다 (Jeon et al., 2014). 지질 과산화는 세포 손상 기전의 일종으로 세포 내에서 산화 스트레스의 지표로써 측정된다. 본 실험에서 고지방 식이 섭취에 따른 어미의 지질 과산화 정도를 측정한 결과, 고지방 식이 어미군의 혈액과 간에서 모두 유의적으로 높은 수치를 보였다. 이와 관련하여 간 내 항산화 효소의 mRNA 발현 정도를 측정한 결과, 산화 스트레스에 의한 방어 기제로 작용하는 항산화 효소인 HO-1과 NADPH 산화효소 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)의 구성 요소인 p40phox의 유전자 발현이 유의적으로 낮게 나타났다 (Figure 6).

염증 대사를 확인하기 위해 MCP-1을 혈청과 간내 유전자 발현을 측정한 결과, 혈청에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 고지방 식이군의 간 내 mRNA 발현 정도는 유의적으로 높게 나타났다. 그 밖의 다른 염증 지표인 TNF α 와 CD68에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Figure 7). 종합적으로, 고지방 식이를 섭취한 어미는 산화 스트레스의 증가와 적절한 항산화 효소의 발현 증가가 나타나지 않아, 체내 산화 스트레스가 적절히 처리되지 않은 것으로 보인다.

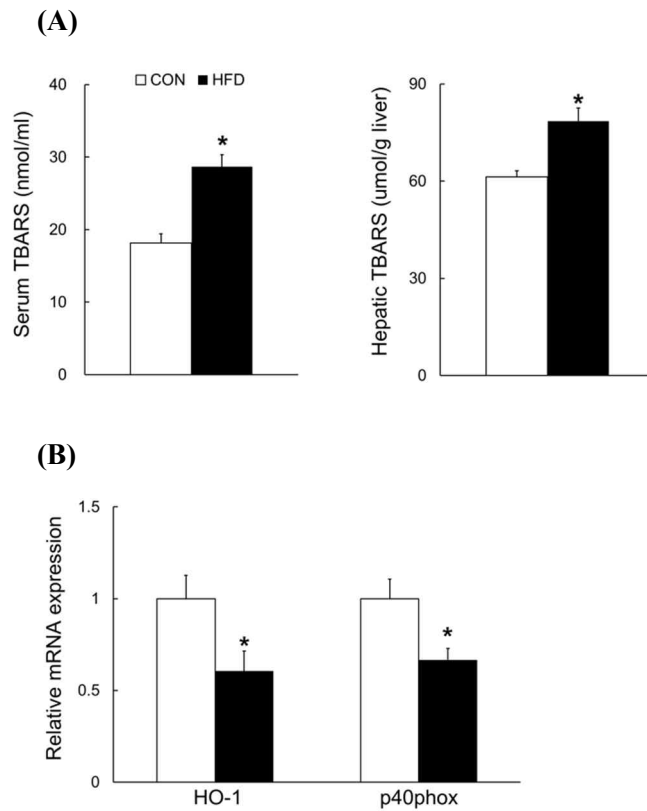


Figure 6. Effects of maternal high fat diet consumption on oxidative stress of dams

(A) Serum and hepatic TBARS levels and (B) relative mRNA expressions of HO-1 and p40phox of dams. Relative mRNA levels were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

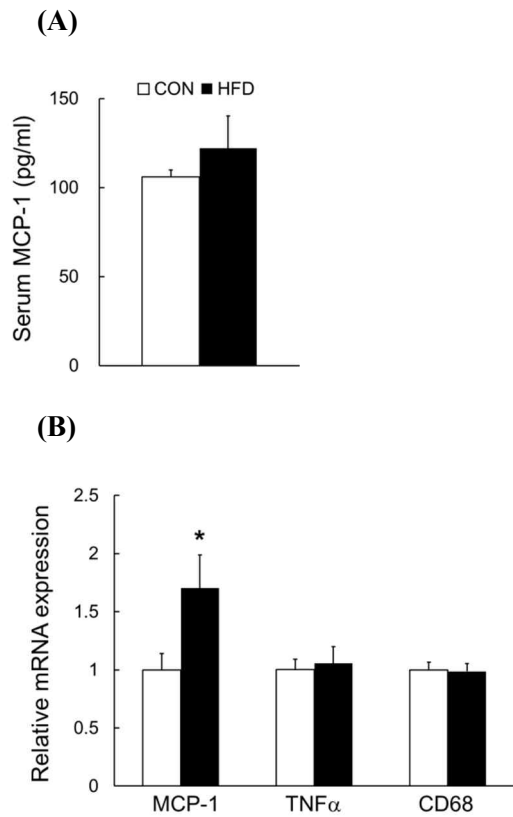


Figure 7. Effects of maternal high fat diet consumption on inflammation of dams

(A) Serum MCP-1 levels and (B) hepatic mRNA levels of genes involved in inflammation. Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON n=7, HFD n=5). * $P < 0.05$ compared with CON (Student's t-test).

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

7. 자손의 체중 및 해부 시 조직 무게

실험기간 중 자손의 체중과 수유 직후 자손의 기관 무게를 측정한 결과는 다음과 같다. 체중은 수유 중의 측정 시점에서 모두 자손군 간의 유의적인 차이가 없었다 (Figure 8). 금식 후 생후 21 자손의 해부를 실시하여, 생명활동과 관련된 대사적 기관인 간, 자손에서 발달 상태를 확인할 수 있는 뇌, 면역관련 기관인 비장, 염증 및 혈압 관련 기관인 신장과 지질 축적기관인 지방의 조직 무게를 측정한 결과, 모든 기관에서 군간의 유의적인 차이는 없었다. 체중 대비 조직의 상대 무게는 지방에서만 고지방식이 자손군이 유의적으로 높았고, 나머지 지표들은 군간의 차이가 나타나지 않았다 (Table 4).

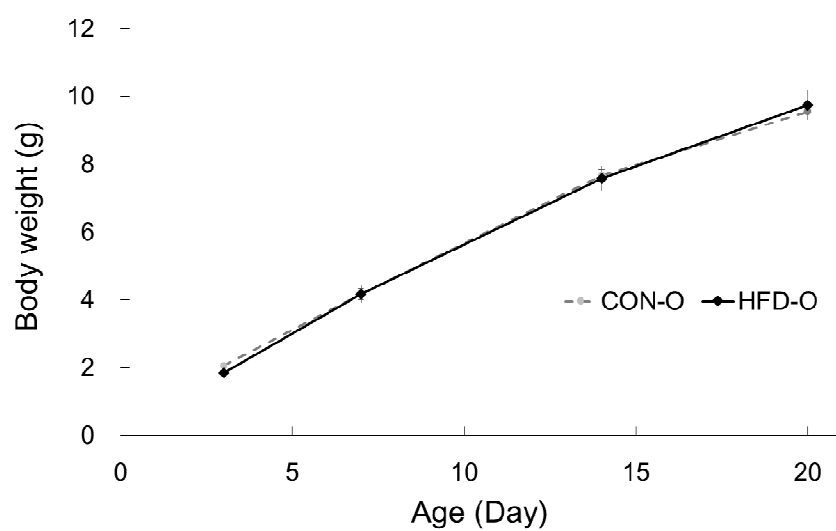


Figure 8. Body weight of male offspring during experimental period

Body weight of male offspring at postnatal day 3, 7, 14 and 20. Data are presented as mean \pm SEM (CON-O n=12, HFD-O n=7). * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

Table 4. Body and organ weight of male offspring

Group	CON-O (n = 12)	HFD-O (n = 7)
Body weight (g)	8.89 ± 0.12	9.10 ± 0.42
Organ weight (g)		
Liver	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.02
Brain	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00
Kidney†	0.13 ± 0.00	0.14 ± 0.01
Spleen	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Epididymal fat	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.01
Relative organ weight (% body weight)		
Liver	3.58 ± 0.09	3.82 ± 0.05
Brain	4.65 ± 0.08	4.60 ± 0.17
Kidney†	1.45 ± 0.03	0.14 ± 0.01
Spleen	0.63 ± 0.04	0.73 ± 0.05
Epididymal fat	0.42 ± 0.03	0.69 ± 0.11*

Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

† Sum of left and right kidney

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

8. 자손의 혈청 및 간 조직의 생화학적 분석 및 어미 지표와의 상관관계

어미의 고지방 식이에 따른 수컷 자손의 혈청을 분석한 결과는 다음과 같다. 혈당, 중성지방, ALT에서는 군간의 유의미한 차이를 보이지 않았고, 총 콜레스테롤에서 고지방 식이 자손군이 유의적으로 높은 값을 나타냈다. 자손의 간 내 지질 축적을 확인한 결과, 자손에서 중성지방과 콜레스테롤의 축적 정도는 단백질로 보정했을 때 유의적인 차이가 없었으며 (Table 5), 간 무게로 보정했을 때 역시 식이 섭취 군간의 차이가 없었다. (중성지방; 대조 식이 자손군, 12.6 ± 0.4 mg/g liver, 고지방 식이 자손군, 12.0 ± 1.1 mg/g liver, $P=0.413$, 콜레스테롤; 대조 식이 자손군, 1.6 ± 0.1 mg/g liver, 고지방 식이 자손군, 1.6 ± 0.1 mg/g liver, $P=0.583$). 추가적으로 H&E 염색을 통해, 각각 100배율, 200배율로 간 내 축적된 지방 구의 크기를 확인하였으나 군간의 큰 차이는 보이지 않았다 (Figure 9).

자손에서 고지방 식이섭취의 영향을 나타내는 혈중 콜레스테롤과 어미 지표간의 상관관계를 확인해본 결과, 어미의 간 무게와 음의 상관관계 ($r=-0.782$, $P=0.013$), 간 TBARS 와 양의 상관관계 ($r=0.699$, $P=0.036$)을 나타냈다 (Figure 10).

Table 5. Serum and hepatic biochemical parameters of male offspring

Group		CON-O (n=12)	HFD-O (n=7)
Serum			
	Glucose(mg/dL)	119.6 ± 5.6	131.0 ± 12.1
	TG (mg/dL)	50.7 ± 4.2	60.1 ± 8.3
	TC (mg/dL)	81.3 ± 3.3	93.7 ± 3.7 *
	ALT (IU/L)	26.3 ± 3.9	38.6 ± 12.7
Liver			
	TG (µg/mg protein)	63.9 ± 1.9	66.5 ± 6.3
	Cholesterol (µg/mg protein)	8.2 ± 0.5	8.6 ± 0.4

Data are presented as mean ± SEM. * P<0.05 compared with CON-O (Student's t-test).

AST; Aspartate Aminotransferase, CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group, TC; Total cholesterol, TG; Triacylglycerol

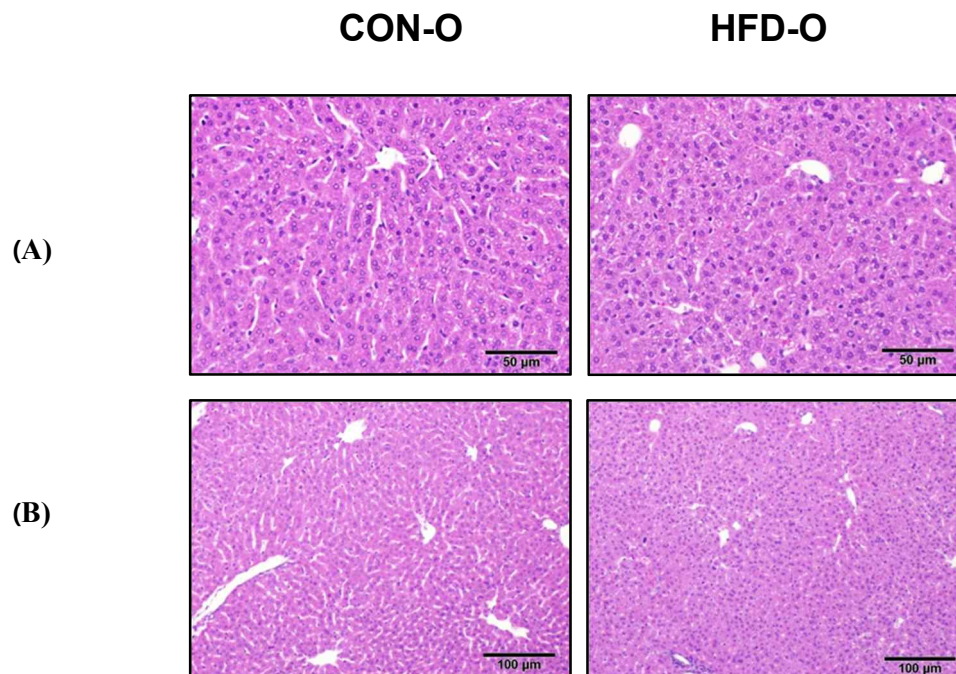


Figure 9. H&E staining of liver tissue sections of male offspring

H&E staining of offspring liver sections for histopathologic analysis (n=4 per group, magnification (A) x100 and (B) x200).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

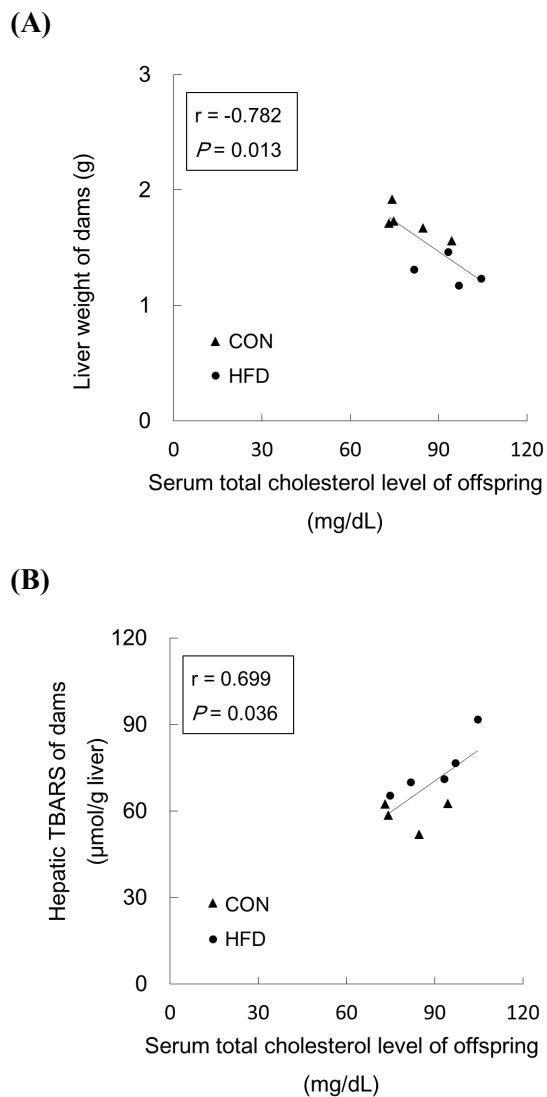


Figure 10. Correlation between offspring serum cholesterol level and dam biochemical parameters

Correlation between offspring serum cholesterol level and (A) liver weight of dams or (B) hepatic TBARS levels of dams. Pearson's correlation coefficient, r and p -value are indicated for each region.

CON; Control diet group, HFD; High fat diet group

9. 자손의 간 내 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현

혈청 콜레스테롤이 고지방 식이 자손군에서 높은 수치를 보여, 이와 관련된 간 내 mRNA 발현 차이를 확인하고자 하였다. 앞선 어미의 연구에서 유의적으로 나타난 전사인자인 $LXR\alpha$, SREBP-2, 지단백질 수용체인 LDLR, 스테롤 수송체인 ABCG, 콜레스테롤 생성의 제한 효소인 HMGCR 를 측정하였고, ABCG8 에서만 고지방 식이 자손군이 유의적으로 낮은 수치를 보여, 선행연구 (Mischke et al., 2013)와 동일하게 수컷 자손의 콜레스테롤 대사상의 변화는 간 내 콜레스테롤 생성의 차이가 아닌, 간 내 콜레스테롤 수송체 발현의 변화로 인한 표현형임을 관찰하였다 (Figure 11).

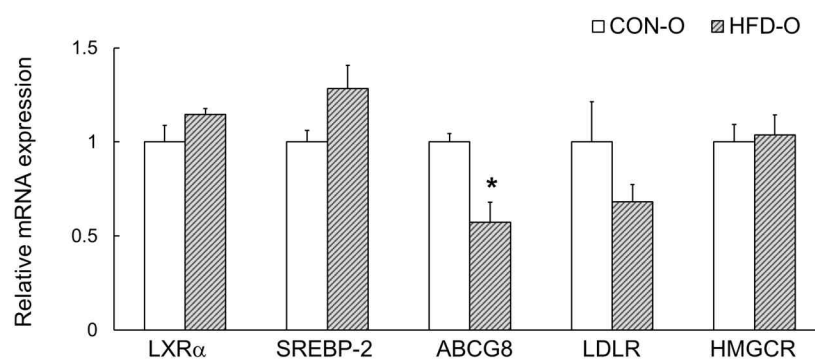


Figure 11. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA levels of genes involved in cholesterol metabolism of male offspring.

Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON-O n=6, HFD-O n=6). * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

10. 자손의 간 발달

본 연구에서 어미의 고지방 식이 섭취에 따른 수컷 자손의 간 발달 차이를 확인하기 위하여, 세포 증식지표인 PCNA, 간 발달 지표인 β -catenin (Apte et al., 2007)과 세포 사멸 지표인 cleaved caspase-3 를 Western blot 으로 측정된 결과, 군간의 유의적인 차이는 모두 나타나지 않았다 (Figure 12).

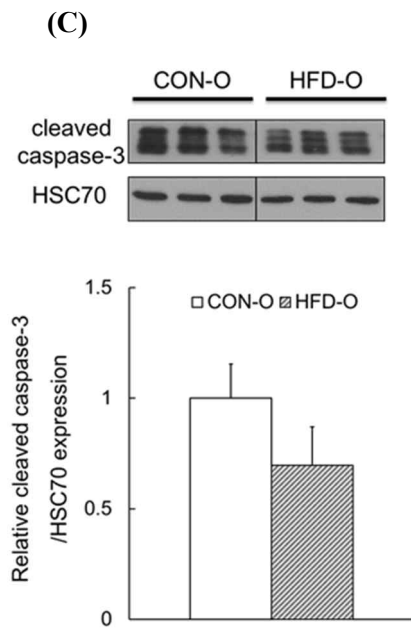
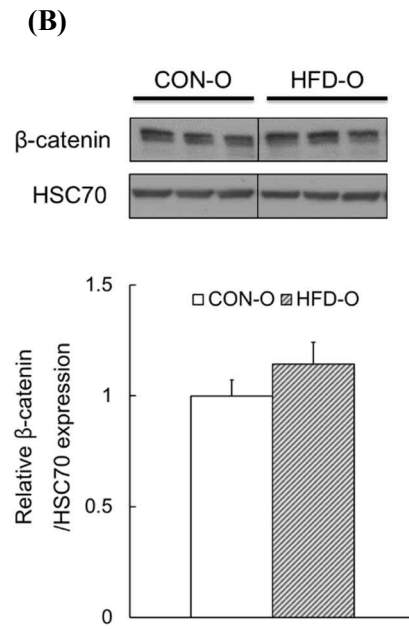
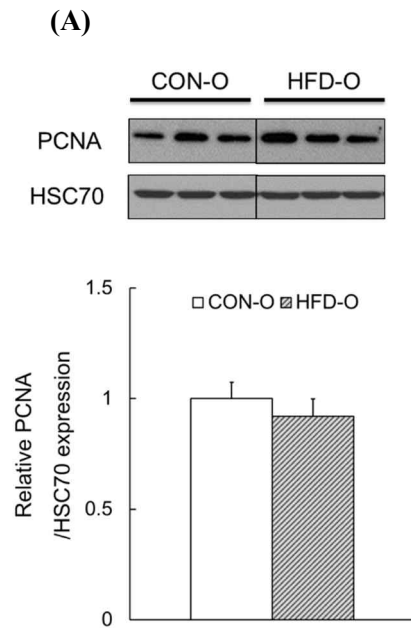


Figure 12. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic cell proliferation and apoptosis of male offspring

Relative hepatic (A) PCNA, (B) β -catenin, and (C) cleaved caspase-3 protein levels of male offspring. Representative immunoblot of each protein was normalized to HSC70. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

11. 자손의 간 내 산화스트레스 및 염증 유전자 발현

자손의 기능 대사적 변화를 확인하기 위해 앞선 어미에서 측정하여 군간 차이를 나타낸, 간 내 항산화 효소 유전자와 염증 유전자 발현을 확인해보았다. 항산화 효소인 HO-1, p40phox 와 염증지표인 MCP-1 유전자 발현 정도는 모두 자손군 간의 유의적인 차이가 없었다 (Figure 13). 이를 통해 본 연구에서 어미의 고지방 식이에 따른 자손의 항산화 및 염증 대사의 차이는 나타나지 않았다고 사료된다.

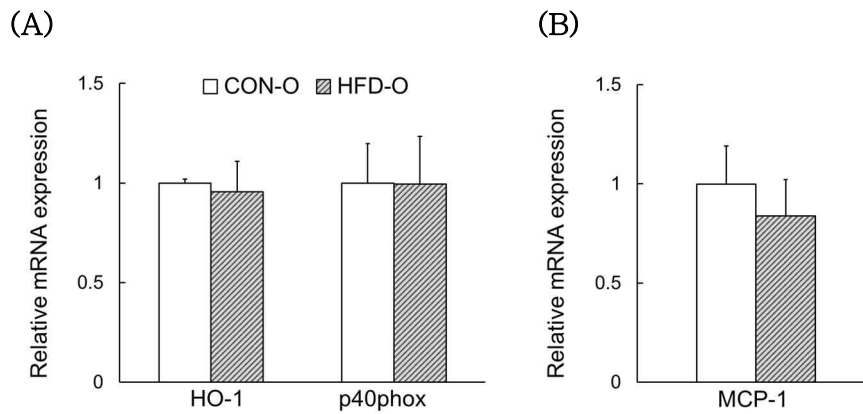


Figure 13. Effects of maternal high fat diet consumption on hepatic mRNA expression of anti-oxidative enzyme and inflammation of male offspring.

Relative mRNA expressions of genes involved in (A) anti-oxidative enzyme and (B) inflammation. Relative mRNA expressions were analyzed by real-time PCR and normalized to RPL19 as endogenous control. Data are presented as mean \pm SEM (CON-O n=6, HFD-O n=6). * $P < 0.05$ compared with CON-O (Student's t-test).

CON-O; Offspring of control diet group, HFD-O; Offspring of high fat diet group

IV. 고찰

본 연구에서는 암컷 C57BL/6 마우스에게 대조 식이와 고지방 식이를 임신 전 3주, 임신기 및 수유기동안 제공한 후, 어미의 생리화학적 변화 및 간 내 유전자 변화를 분석하여 자손의 대사적 변화와의 상관관계를 확인해보았다. 실험 결과를 통해 고지방 식이를 섭취한 어미 군과 그 자손군의 지질 대사 변화를 관찰할 수 있었다. 또한, 어미의 고지방 식이 섭취가 임신기에 정상적으로 이루어져야 할 간 중대를 저해하고 산화 스트레스를 유발하며, 이러한 대사상 문제로 인해 자손에서 적절한 콜레스테롤 조절이 이루어지지 않음을 관찰하였다.

실험군은 임신 전, 임신기 및 수유기동안 고지방 식이군의 에너지 섭취량이 유의적으로 높은 고지방 고에너지 섭취 모델로, 대조군과는 다양한 해부학적, 생화학적 차이를 나타내었다. 본 연구는 선행연구들을 통해 고지방 섭취시 어미에서 변화하는 것으로 보고되는 지표들인 지질 대사, 세포 주기 및 증식, 산화 스트레스, 염증 지표를 측정하고, 자손의 지표 변화와의 상관관계를 알아보고자 하였다. 또한, 수유직후 고지방 식이 어미 군에서 높게 나타나던 간 조직 무게가 (Shankar et al., 2010) 본 연구에서는 반대로 더 낮은 값을 보여, 그 원인을 찾는 데에 초점을 맞추었다.

고지방 식이로 인한 어미 마우스의 간 무게가 지질 축적과 연관 있는지 확인하고, 지질 대사의 변화 유무를 관찰하기 위해, 혈중 및 간 내 지질 축적 정도를 측정하였다. 혈중 지표 중 지질 대사관련 지표인 중성지방 및 콜레스테롤은 고지방 식이군에서 모두 유의적으로 높은 값을 보였고, 간 내 지질 중 중성지방은 고지방 식이군에서, 콜레스테롤은 대조 식이군에서 유의적으로 높은 값을 보였다. 중성지방의 경우 고지방 식이를 섭취한

어미군에서 혈중, 간 축적량 모두 높게 나타났으며, 해부시 지방조직의 무게 역시 유의적으로 높았다. 이와 관련된 대사적 기전을 확인하였을 때, 주요 전사인자, 지방 합성, β -산화 관련 유전자 발현량에서 모두 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 단일 불포화 지방산 합성 효소인 SCD1만 고지방 식이 어미군에서 유의적으로 낮은 유전자 발현량을 보였다. 이를 통해 군간의 간 내 중성지방 대사 유전자의 발현의 차이가 없음에도 불구하고, 전체적인 중성지방은 고지방 식이를 통해 지방조직 저장량 이상으로 과도하게 축적되어, 혈중 및 간 내에서 높은 수치를 나타낸 것으로 보인다. 또한, SCD1의 mRNA 발현량 감소로 어미의 간 내 불포화 지방산 합성이 저해되고, 포화지방산의 축적이 유발되며, 포화지방산으로 인한 지방간과 같은 지질 관련 질환이 유발되기 쉬울 것으로 사료된다 (Geng et al., 2015). 콜레스테롤 분석 결과에서는, 중성지방과 달리 혈액과 간 조직 사이에 서로 다른 경향을 보였다. 간 조직에서는 콜레스테롤 관련 전사인자인 LXR α , SREBP-2과 그 하위 인자인 스테롤 수송체 ABCG8 및 지단백질 수용체 LDLR의 mRNA 발현량 증가를 관찰하였다. 간 내 콜레스테롤의 생합성은 주로 SREBP-2의 발현에 의해 조절되므로, 본 실험의 고지방 식이군의 간 내 SREBP-2의 활성 증가 현상은 간 세포 내 낮은 콜레스테롤 함량에 대한 반응으로 사료되며 (Goharkhay et al., 2008), 하위 유전자인 지단백질 수용체 LDLR 유전자 발현의 증가 또한 관련이 있을 것으로 생각된다. 따라서 콜레스테롤의 혈중 및 간 내 경향은 생성 및 배출량의 변화 보다는, 위와 같은 유전자 발현의 차이로 인해 콜레스테롤의 유입이 혈중에서 간 내로 적절하게 이루어지지 않아, 혈중 농도는 높은 수치로 유지되고, 간 축적량은 낮게 나타난 것과 연관 있을 것으로 사료된다. 추가적으로, 본 실험에서는 대표적 지질인 중성지방 및 콜레스테롤 외에 간 내 담즙 축적량을 측정하였다. 임신기간 중 태아에서

배출하지 못한 담즙은 어미에서 대사되며 이를 통해 간 내 담즙 축적 및 배출이 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Marin et al., 2008; Papacleovoulou et al., 2011; Zhu et al., 2013). 본 실험에서는 임신기간 중 고지방식으로 인해 이 대사에 문제가 생길 경우 담즙산 배출능력이 손상될 것이며, 그에 따른 독성 효과로 자손의 생화학적 대사가 영향을 받았을 것으로 가정하였다. 그러나 어미의 간 내 담즙 축적량과 간 내 담즙 배출의 주요 유전자인 BSEP의 발현량을 측정한 결과, 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다 (각각 $P=0.881$, $P=0.858$). 따라서 고지방 식이로 인한 담즙 축적 및 배출 대사의 불균형이 형성되었다고 생각하기 어렵고, 이로 인한 어미의 간 독성 및 간 증대를 설명할 수 없을 것으로 사료된다. 종합적으로, 고지방 식이 섭취로 인해 어미의 간 조직 내 중성지방, 콜레스테롤의 대사적인 변화를 관찰하였으나, 간 지질 및 담즙의 절대적인 축적량을 확인하였을 때, 이 축적량이 어미 마우스의 간에서 군간의 유의적인 무게 차이를 설명하기는 어려울 것으로 사료된다.

특이적으로, 임신기 어미의 간 조직은 증가하는 대사적 요구량으로 인해 세포 크기 증가와 세포 수 증식을 진행하며 (Zou et al., 2013), 이러한 임신기동안 변화된 간 조직은 수유기동안 유지되는 것으로 알려져있다 (Bustamante et al., 2010). 본 연구에서는 출산 직후까지의 어미의 체중은 군간 유의적인 차이가 없었고, 수유기에 이르러 고지방 식이 섭취 군의 체중이 유의적으로 높게 나타났다. 본 연구에서는 임신기까지 군간의 유의적인 체중차이가 없었고, 수유기가 종료된 시점에는 고지방 식이 어미군의 체중이 더 높아졌음에도 불구하고, 임신기동안의 체중의 증가의 영향을 받는 것으로 알려져 있는 간 조직의 무게가 유의적으로 낮았다. 이는 선행 연구에서와는 (Shankar et al., 2010) 다른 표현형이므로, 이 현상을 규명하기 위해 간 지질 외에 총 DNA 함량과 단백질 함량 측정을

실시하였다. 임신기의 간은 세포 증식을 통해 태아 및 태반 성장을 위한 대사적 요구를 수용하고, 이에 따라 비례적으로 총 DNA 함량의 증가, 간 조직 크기의 증가와 같은 특징을 나타낸다. 이 때 간은 세포의 밀도가 늘어나는 변화 대신, 대사적 기능을 담당하는 세포 수의 증가를 통해 간 조직 전체의 DNA 함량을 증가시킨다. 따라서 간 조직 g 당 DNA 함량이 아닌 간 조직 내 총 DNA 함량이 중요한 의미를 가진다. 또한 총 단백질 함량은 간 조직 무게 증가가 지질 축적 등으로 인한 증가가 아니며, 대사적 활동이 가능한 세포 및 효소 등에 의한 증가임을 확인하기 위해 추가적으로 측정 하였다. 실험결과 고지방 섭취 어미 군의 총 DNA 및 단백질 함량이 모두 유의적으로 낮게 나타났고, 수유기가 종료된 직후인 출산 후 21일에서 PCNA와 cleaved caspase-3 단백질 발현의 유의적인 차이가 나타나지 않은 것을 관찰하였다. 간 내 총 DNA 함량과 단백질 함량은 간의 증대와 비례하는데, 본 실험 결과를 통해 고지방 섭취 어미 군에서 임신기에 정상적인 간 증대가 이루어지지 않았으며, 수유기간동안 이 간 증대를 회복하기 위한 보충(catch-up growth) 작용 역시 나타나지 않았음을 시사한다.

고지방식이를 섭취한 어미의 간은 임신기의 간 증대의 저해와 더불어 과산화물 처리 기능을 적절히 수행하지 못한 것으로 사료된다. 선행연구들에서는 출산 전후의 산화 스트레스가 산화 지질 및 단백질 복합체 혹은 유전자 발현 조절을 통해, 자손이 대사적 질환에 영향 받기 쉬운 환경을 형성하는 것으로 보고하고 있으며 (Al-Gubory et al., 2010; Sen and Simmons, 2010), 특히 oxysterol을 통한 태아의 부적절한 발달에 대한 영향이 보고되고 있다 (Baardman et al., 2013). 이를 통해 임신 전 및 임신기 어미의 부적절한 과산화 상태가 자손의 성장 및 발달과 성인기 질병 유발에 영향을 미친다는 점을 시사한다 (Al-Gubory et al.,

2010). 본 연구의 결과에서는 선행 논문들에서 보고된 바와 같이 임신 및 수유기의 고지방 식이 섭취에 의한 간 내 높은 염증 사이토카인이 확인되었다 (Ashino et al., 2012). 간 외의 다른 조직 중 지방조직에서는 임신기의 비만 상태가 지방조직에서 분비되는 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)을 통해 태반에서 산화 스트레스 및 염증을 유발하는 것으로 보고되었다 (Ashino et al., 2012). 또한, 고지방 섭취는 유선 조직의 모유 생성 및 분비의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 유선 조직 내 세로토닌 생합성 증가로 염증 반응을 촉진할 수 있는 것으로 생각된다 (Hernandez et al., 2012).

임신기의 어미 체중과 수유기 중 자손 체중이 유의미한 군간의 차이를 나타내지 않았다. 이는 상대적으로 낮은 지방 함량의 실험 식이 (총 에너지 중 45% 지방)와 비교적 짧은 임신 전 식이 제공기간의 영향일 것일 가능성이 있다. 단순히 고지방 식이를 섭취하는 것뿐만 아니라, 어미의 체중 변화가 자손의 대사 변화에 본 연구와는 다른 방향의 영향을 미칠 것으로 예상되므로 (Shankar et al., 2010), 본 연구의 결과를 바탕으로 후속연구에서는 식이 내 지방 함유비율 및 기간을 모두 고려한 실험적 설계를 권장하는 바이다.

수유 종료 직후 자손 분석 결과, 절대 및 체중 대비 상대 간 무게, 간 세포 증식, 성장 및 발달의 차이가 나타나지 않았다. β -catenin은 세포 증식, 분화와 배아기 간 발달 등 세포의 분열이 많이 일어나는 시기에 활성화 되며, 마우스의 경우 10일에서 15일 쯤 배아 및 출생 후 5일에서 20일 간에 활성을 나타내어 간 발달의 정도를 나타낸다 (Apte et al., 2007), 고지방, 고자당(high sucrose)를 포함한 western-style 식이를 섭취한 어미의 생후 14일의 수컷 자손에서 Wnt/ β -catenin 경로 억제를 통한 간 발달 저해가 일어남이 한 선행연구를 통해 보고되었다 (Mischke

et al., 2013). β -catenin 발현량을 비교하여, 이 연구를 생후 21의 자손 분석인 본 실험과 비교하였을 때, 자손 간의 발달 저해가 회복 성장을 통해 생후 21일에서 회복되었을 것으로 사료된다. 또한, 동일한 연구에서 생후14일 시기의 간 내 낮은 콜레스테롤 수치가 본 연구에서는 관찰되지 않았는데, 이는 식이에 의해 일어난 Wnt/ β -catenin 경로 저해와 간 세포 증식 저해가 수유기 종료시인 β -catenin의 회복 전에 이미 자손의 콜레스테롤 조절 문제를 야기한 것으로 생각된다 (Mischke et al., 2013).

고지방 식이 섭취로 인해 서로 영향을 미칠 것으로 예상되는, 어미의 혈중 지질과 자손의 혈중 총 콜레스테롤과의 상관관계를 분석하였으나, 어미의 지질 대사 변화가 자손의 지질 대사에 유의적인 영향을 미치지 못함을 확인하였다 (중성지방; $r=0.146$, $P=0.707$, 콜레스테롤; $r=0.145$, $P=0.710$). 반면, 특이적으로 본 실험에서는 어미의 간 무게와 자손의 신장 무게간의 유의미한 상관관계를 확인할 수 있었다 ($r=-0.797$, $P=0.010$). 선행 연구에서는 임신기 래트의 저 단백 섭취에서 신장의 성장 및 발달의 저해를 관찰하였다 (Pham et al., 2003). 따라서 후속 연구에서는 고지방 식이가 신장의 발달에 미치는 영향에 대한 추가적인 고찰이 필요할 것으로 사료된다.

상관관계 분석 결과, 고지방 식이를 섭취한 어미의 간의 크기로 나타나는 임신기 대사적 성장 저해와 산화 스트레스의 증가가 자손의 혈중 콜레스테롤 상승과 유의적인 상관관계를 보였다. 그러나, 본 연구에서는 이러한 고지방 식이에 의한 어미의 임신기 간 증대 저해와 간 산화스트레스 증가가 자손의 콜레스테롤 대사에 영향을 미치기 위한 연결 고리를 명확히 밝히지 못하였고, 이를 해결하기 위해 어미 혈중 TBARS를 태아-어미 간의 매개체로 가정하여 다른 지표와의 상관관계를 확인하였다. 앞서 밝힌 어미 간 TBARS와 자손의 혈중 콜레스테롤과의 유의적인 음의 상관관계와

더불어, 어미의 간 TBARS와 혈중 TBARS의 상관관계가 유의적으로 양의 상관관계를 가지므로 ($r=0.672$, $P=0.047$), 혈중 TBARS를 통한 전달이 자손에게 영향을 미쳤을 것으로 예상할 수 있었다. 그러나 관련 분석결과, 어미의 혈중 TBARS와 자손의 혈중 콜레스테롤과의 상관성에서는 유의미한 상관관계를 나타내지 않았다 ($r=0.481$, $P=0.190$). 따라서, 추후 이를 연결하는 혈액 혹은 태반, 모유 등 다른 기전적인 원인에 대한 보다 명확한 심층 연구가 필요할 것이다.

본 연구는 수유 종료 직후인 한 개의 분석 시점을 사용하였기 때문에, 임신기 및 수유기의 다양한 체내 대사변화를 모두 관찰하는 데는 한계가 있었다. 특히, 수유기가 종료되는 출산 후 3주 시점에는 임신 및 수유기에 특이적으로 변화하는 대사 지표들이 ABCG8 및 지질 축적량 등 일부를 제외하고는 일반 성인기 수치로 되돌아가기 때문에 기전적으로 이를 모두 확인하기 어려웠다 (Aleksunes et al., 2012). 그러나 본 연구에서는 수유기까지 유지되는 임신기의 간 증대와 총 DNA 및 단백질 함량과의 관계를 통해, 직간접적으로 임신기의 간 변화를 고찰한데에 큰 의의가 있다.

결론적으로, 본 연구에서는 손상된 어미의 간 증대와 증가된 간 내 산화 스트레스가 자손의 지질 항상성 유지에 영향을 주었을 가능성을 제안하였다. 이후, 임신기에서 이러한 간 증대의 저해를 일으키는 고지방 식이의 어미와 자손을 연결하는 분자적 기전에 대한 여러 시기에 따른 후속 연구를 제안하는 바이다.

V. 요약 및 결론

고지방 관련 선행 연구들에서는 각 실험의 실험기간, 종 및 식이 조성 등 실험 조건에 따라 동일하게 고지방 식이를 연구한 결과임에도 자손의 체중 및 생화학 지표 등이 상이하게 나타나고 있다. 본 연구에서는 어미 마우스와 그 자손을 함께 분석하여 고지방식이 유발하는 어미의 어떠한 대사적 변화 요인이 자손의 대사적 변화와 관련 있는지를 고찰해 보았다.

본 실험에서 고지방 식이를 섭취한 어미에서 나타나는 대사적인 변화를 요약하면 다음과 같다. 첫째, 임신 전, 임신기 및 수유기동안 군간의 체중 차이는 수유기에서만 나타났고, 특이적으로 간 조직 무게 및 간 체중 비가 대조 식이군에 비해 고지방 식이군이 유의적으로 낮았다. 둘째, 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 간 중성지방의 경우 고지방 식이군에서 유의적으로 높았으나, 간 콜레스테롤은 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 지질 대사 및 지단백질 수용체의 유전자 발현을 확인한 결과, 불포화지방산 전환 대사와 콜레스테롤의 간 내 수송 대사의 문제를 관찰할 수 있었다. 셋째, 간 내 총 DNA 및 단백질 함량이 고지방 식이군에서 유의적으로 낮게 나타났으며, PCNA, cleaved caspase-3 단백질 발현의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 일반적으로 임신기에는 간 대사 요구량 증가 및 체중 증가로 간 증식이 활발히 일어나 간의 크기가 커지게 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험 결과는 고지방 식이로 인해 임신기 중 대사적 요구를 수용할 충분한 간 증대가 일어나지 않았음을 시사하며, 수유기 중 회복성장 역시 일어나지 않아 간 무게의 유의적인 차이를 보였다고 사료된다. 넷째, 고지방 식이군에서는 간 내 높은 지질 과산화물 수치와 더불어 항산화 효소의 mRNA 발현 감소를 보였다.

자손군의 분석 결과, 체중 및 해부 시 간, 뇌, 신장, 비장 조직 무게 및

상대 무게는 군간 유의적인 차이가 없었고, 상대 지방조직 무게에서만 유의적인 차이를 보였다. 혈청 분석 및 간 지질 분석에서는 혈중 콜레스테롤에서만 고지방식이 자손군의 수치가 유의적으로 높았으며, 관련하여 간 내 스테롤 수송체의 유전자 발현감소를 관찰하였다. 항산화 효소 지표와 염증지표에서는 군간의 유의미한 차이가 나타나지 않았다.

식이에 따른 어미와 그 자손 대사 지표의 상관관계를 확인해 본 결과, 자손의 혈중 콜레스테롤은 임신기 요구 대사 충족을 위한 간 증대의 결과인 간 조직 절대 무게와는 음의 상관관계를 ($r=-0.782$, $P=0.013$), 간 내 지질 과산화물인 TBARS와는 양의 상관관계 ($r=0.699$, $P=0.036$)를 나타냈다.

위의 결과를 종합하면, 본 연구에서는 고지방 식이를 섭취한 어미에서는 임신기에 불충분한 간 증대와 증가된 산화스트레스를 보이며, 이 같은 어미 마우스의 변화가 수유 직후의 자손의 콜레스테롤 조절에 영향을 주었을 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Al-Gubory KH, Fowler PA and Garrel C (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(10): 1634-1650.
- Aleksunes LM, Yeager RL, Wen X, Cui JY and Klaassen CD (2012) Repression of hepatobiliary transporters and differential regulation of classic and alternative bile acid pathways in mice during pregnancy. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 130(2): 257-268.
- Alfaradhi MZ, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Musial B, Fowden A and Ozanne SE (2014) Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 307(1): R26-34.
- Amine E, Baba N, Belhadj M, Deurenbery-Yap M, Djazayery A, Forrester T, Galuska D, Herman S, James W and MBuyamba J (2002) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. World Health Organization.
- Aoki N, Yamaguchi Y, Ohira S and Matsuda T (1999) High fat feeding of lactating mice causing a drastic reduction in fat and energy content in milk without affecting the apparent growth of their pups and the production of major milk fat globule membrane components MFG-E8 and butyrophilin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 63(10): 1749-1755.
- Apte U, Zeng G, Thompson MD, Muller P, Micsenyi A, Cieply B, Kaestner KH and Monga SP (2007) beta-Catenin is critical for early postnatal liver growth. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 292(6): G1578-1585.
- Aranceta J and Perez-Rodrigo C (2012) Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *The British journal of nutrition* 107 Suppl 2: S8-22.
- Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, Torsoni AS and Torsoni MA (2012) Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *The Journal of nutritional biochemistry* 23(4): 341-348.
- Aye IL, Powell TL and Jansson T (2013) Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta* 34

Suppl: S40-45.

- Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Berger RM, Bakker MK, Hofstra RM and Plosch T (2013) The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights. *Biology of reproduction* 88(1): 24.
- Bringhenti I, Ornellas F, Martins MA, Mandarim-de-Lacerda CA and Aguila MB (2015) Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice. *Nutrition research* (New York, NY) 35(2): 136-145.
- Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA, McConnell JM and Byrne CD (2009) Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* (Baltimore, Md) 50(6): 1796-1808.
- Bustamante JJ, Copple BL, Soares MJ and Dai G (2010) Gene profiling of maternal hepatic adaptations to pregnancy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30(3): 406-415.
- Cannon MV, Buchner DA, Hester J, Miller H, Sehayek E, Nadeau JH and Serre D (2014) Maternal nutrition induces pervasive gene expression changes but no detectable DNA methylation differences in the liver of adult offspring. *PloS one* 9(3): e90335.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N and Rando OJ (2010) Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143(7): 1084-1096.
- Cetin I, Parisi F, Berti C, Mando C and Desoye G (2012) Placental fatty acid transport in maternal obesity. *Journal of developmental origins of health and disease* 3(6): 409-414.
- Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM and Hauguel-de Mouzon S (2008) Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 29(3): 274-281.
- Cianfarani S, Agostoni C, Bedogni G, Berni Canani R, Brambilla P, Nobili V and Pietrobelli A (2012) Effect of intrauterine growth retardation on liver and long-term metabolic risk. *International journal of obesity* (2005) 36(10): 1270-1277.
- Dai G, Bustamante JJ, Zou Y, Myronovych A, Bao Q, Kumar S and Soares MJ (2011) Maternal hepatic growth response to pregnancy in the mouse. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ) 236(11): 1322-1332.
- Du Y, Yang M, Lee S, Behrendt CL, Hooper LV, Saghatelian A and Wan Y (2012) Maternal western diet causes inflammatory milk and TLR2/4-dependent

- neonatal toxicity. *Genes & development* 26(12): 1306-1311.
- Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J and Vickers MH (2011) Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. *PloS one* 6(7): e21662.
- Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK and Hanson MA (2009) Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *The British journal of nutrition* 102(4): 514-519.
- Folch J, Lees M and Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226(1): 497-509.
- Franco JG, Fernandes TP, Rocha CP, Calvino C, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Moura EG and Trevenzoli IH (2012) Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *The Journal of physiology* 590(Pt 21): 5503-5518.
- Gaccioli F, White V, Capobianco E, Powell TL, Jawerbaum A and Jansson T (2013) Maternal overweight induced by a diet with high content of saturated fat activates placental mTOR and eIF2alpha signaling and increases fetal growth in rats. *Biology of reproduction* 89(4): 96.
- Ge ZJ, Luo SM, Lin F, Liang QX, Huang L, Wei YC, Hou Y, Han ZM, Schatten H and Sun QY (2014) DNA methylation in oocytes and liver of female mice and their offspring: effects of high-fat-diet-induced obesity. *Environmental health perspectives* 122(2): 159-164.
- Geng T, Xia L, Russo S, Kamara D and Cowart LA (2015) Prosteatotic genes are associated with unsaturated fat suppression of saturated fat-induced hepatic steatosis in C57BL/6 mice. *Nutrition research (New York, NY)* 35(9): 812-822.
- Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C and Thornburg KL (2008) Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine* 359(1): 61-73.
- Godfrey KM and Barker DJ (2001) Fetal programming and adult health. *Public health nutrition* 4(2b): 611-624.
- Goharkhay N, Tamayo EH, Yin H, Hankins GD, Saade GR and Longo M (2008) Maternal hypercholesterolemia leads to activation of endogenous cholesterol synthesis in the offspring. *American journal of obstetrics and gynecology* 199(3): 273.e271-276.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM and Kliever SA

- (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Molecular cell* 6(3): 517-526.
- Hartil K, Vuguin PM, Kruse M, Schmucl E, Fiallo A, Vargas C, Warner MJ, Durand JL, Jelicks LA and Charron MJ (2009) Maternal substrate utilization programs the development of the metabolic syndrome in male mice exposed to high fat in utero. *Pediatric research* 66(4): 368-373.
- Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA and Friedman JE (2010) Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 299(3): R711-722.
- Hernandez LL, Grayson BE, Yadav E, Seeley RJ and Horseman ND (2012) High fat diet alters lactation outcomes: possible involvement of inflammatory and serotonergic pathways. *PloS one* 7(3): e32598.
- Herrera E (2000) Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European journal of clinical nutrition* 54 Suppl 1: S47-51.
- Higa R and Jawerbaum A (2013) Intrauterine effects of impaired lipid homeostasis in pregnancy diseases. *Current medicinal chemistry* 20(18): 2338-2350.
- Hughes AN and Oxford JT (2014) A lipid-rich gestational diet predisposes offspring to nonalcoholic fatty liver disease: a potential sequence of events. *Hepatic medicine : evidence and research* 6: 15-23.
- Jeon S, Park YJ and Kwon YH (2014) Genistein alleviates the development of nonalcoholic steatohepatitis in ApoE(-/-) mice fed a high-fat diet. *Molecular nutrition & food research* 58(4): 830-841.
- Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL and Jansson T (2009) High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(1): 271-278.
- Larque E, Ruiz-Palacios M and Koletzko B (2013) Placental regulation of fetal nutrient supply. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 16(3): 292-297.
- Li M, Reynolds CM, Sloboda DM, Gray C and Vickers MH (2013) Effects of taurine supplementation on hepatic markers of inflammation and lipid metabolism in mothers and offspring in the setting of maternal obesity. *PloS one* 8(10): e76961.
- Li M, Sloboda DM and Vickers MH (2011) Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal

- models. *Experimental diabetes research* 2011: 592408.
- Li S, Tse IM and Li ET (2012) Maternal green tea extract supplementation to rats fed a high-fat diet ameliorates insulin resistance in adult male offspring. *The Journal of nutritional biochemistry* 23(12): 1655-1660.
- Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J and Mangelsdorf DJ (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Molecular cell* 6(3): 507-515.
- Marin JJ, Macias RI, Briz O, Perez MJ, Blazquez AG, Arrese M and Serrano MA (2008) Molecular bases of the fetal liver-placenta-maternal liver excretory pathway for cholephilic compounds. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 28(4): 435-454.
- Milagro FI, Campion J, Garcia-Diaz DF, Goyenechea E, Paternain L and Martinez JA (2009) High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *Journal of physiology and biochemistry* 65(1): 1-9.
- Milona A, Owen BM, van Mil S, Dormann D, Mataki C, Boudjelal M, Cairns W, Schoonjans K, Milligan S, Parker M, White R and Williamson C (2010) The normal mechanisms of pregnancy-induced liver growth are not maintained in mice lacking the bile acid sensor Fxr. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 298(2): G151-158.
- Mischke M, Pruis MG, Boekschoten MV, Groen AK, Fitri AR, van de Heijning BJ, Verkade HJ, Muller M, Plosch T and Steegenga WT (2013) Maternal Western-style high fat diet induces sex-specific physiological and molecular changes in two-week-old mouse offspring. *PloS one* 8(11): e78623.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL and Norman RJ (2005) Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction (Cambridge, England)* 130(5): 583-597.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95(2): 351-358.
- Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S and Williamson C (2011) Nuclear receptor-driven alterations in bile acid and lipid metabolic pathways during gestation. *Biochimica et biophysica acta* 1812(8): 879-887.
- Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL and Lane RH (2003) Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 285(5): R962-970.
- Pruis MG, van Ewijk PA, Schrauwen-Hinderling VB and Plosch T (2014) Lipotoxicity and the role of maternal nutrition. *Acta physiologica (Oxford, England)* 210(2):

296-306.

- Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA and Sattar N (2002) Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 87(9): 4231-4237.
- Segovia SA, Vickers MH, Gray C and Reynolds CM (2014) Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *BioMed research international* 2014: 418975.
- Sen S and Simmons RA (2010) Maternal antioxidant supplementation prevents adiposity in the offspring of Western diet-fed rats. *Diabetes* 59(12): 3058-3065.
- Shankar K, Kang P, Harrell A, Zhong Y, Marecki JC, Ronis MJ and Badger TM (2010) Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology* 151(6): 2577-2589.
- Skogen JC and Overland S (2012) The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. *JRSM short reports* 3(8): 59.
- Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI and Moran TH (2009) Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58(5): 1116-1125.
- Waterland RA and Garza C (1999) Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American journal of clinical nutrition* 69(2): 179-197.
- WHO (2014) Global Health Observatory:(GHO). World Health Organization.
- Williams L, Seki Y, Vuguin PM and Charron MJ (2014) Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochimica et biophysica acta* 1842(3): 507-519.
- Williamson C and Geenes V (2014) Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstetrics and gynecology* 124(1): 120-133.
- Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ and Spencer TE (2004) Maternal nutrition and fetal development. *The Journal of nutrition* 134(9): 2169-2172.
- Yang KF, Cai W, Xu JL and Shi W (2012) Maternal high-fat diet programs Wnt genes through histone modification in the liver of neonatal rats. *Journal of molecular endocrinology* 49(2): 107-114.
- Zheng J, Xiao X, Zhang Q, Yu M, Xu J and Wang Z (2014) Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. *International journal of molecular sciences* 15(9): 14967-14983.
- Zhu MJ, Du M, Nathanielsz PW and Ford SP (2010) Maternal obesity up-regulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the

- mid-gestation sheep placenta. *Placenta* 31(5): 387-391.
- Zhu QN, Xie HM, Zhang D, Liu J and Lu YF (2013) Hepatic bile acids and bile acid-related gene expression in pregnant and lactating rats. *PeerJ* 1: e143.
- Zorn AM (2008) Liver development, in *StemBook*, Harvard Stem Cell Institute
Copyright: (c) 2008 Aaron M. Zorn., Cambridge (MA).
- Zou Y, Hu M, Bao Q, Chan JY and Dai G (2013) Nrf2 participates in regulating maternal hepatic adaptations to pregnancy. *Journal of cell science* 126(Pt 7): 1618-1625.

Abstract

Effects of maternal high fat diet on liver enlargement and oxidative stress of dams and lipid metabolism of offspring mice

Juyoung Kim

Department of Food and Nutrition

Graduate school

Seoul National University

Maternal nutrition affects development of diseases, such as type 2 diabetes, obesity, and non-alcoholic fatty liver disease in adult offspring. In spite of several previous animal studies of maternal high fat diet (HFD), transgenerational effects of HFD remain unclear because of their dissimilar results. Therefore, to determine which parameters of dams were associated with the metabolic outcomes in offspring, this study investigated the effects of maternal HFD consumption on metabolic phenotypes and hepatic gene expression of dams and offspring. Five-week-old virgin female C57BL/6 mice were used for this study. Experimental animals were randomly divided into two groups of a control diet (10% calories from fat) or a high fat diet (HFD: 45% calories from fat) and were provided these diets for three weeks before mating and during gestation and lactation. Dams and their male offspring were sacrificed at weaning. Body weights at weaning, adipose tissue weights, and serum triacylglycerol and total cholesterol levels of HFD-fed dams were higher than those of control diet fed

dams. Hepatic triacylglycerol levels were increased and stearyl-CoA desaturase mRNA levels were decreased by maternal HFD intake. In contrast, hepatic cholesterol levels of HFD-fed dams were significantly lower and mRNA levels of genes involved in cholesterol metabolism (LXR α , SREBP-2, FXR, LDLR, and ABCG8) of HFD-fed dams were significantly higher in comparison to those of control diet fed dams. Especially, lower liver weights of HFD-fed dams were measured in this study. Total DNA contents and total protein contents, which represent pregnancy-induced liver enlargement for metabolic demand, were decreased by maternal HFD consumption. Hepatic protein levels of proliferating cell nuclear antigen and cleaved caspase-3 were measured to investigate catch-up growth during lactation, but there were no significant differences between the two groups. In the point of oxidative stress metabolism, increased 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in serum and liver and decreased hepatic mRNA expression levels of anti-oxidative enzymes including heme oxygenase-1 and p40phox were observed in HFD-fed dams. In the offspring of HFD fed dams, relative adipose tissue weights and serum cholesterol levels were significantly higher than the offspring of control diet fed dams. Significantly lower hepatic gene expression levels of sterol transporter, ABCG8 were observed in the offspring of HFD-fed dams. Based on these results, serum cholesterol levels of offspring had a negative correlation with the liver weights of dams and a positive correlation with the hepatic lipid peroxidation levels of dams. In conclusion, this study suggests that maternal HFD disturbed an anti-oxidative system and pregnancy-related liver adaptation of dams, and these maternal metabolic changes affected cholesterol metabolism regulation of postnatal day 21 of offspring.

Keywords: maternal high fat diet, offspring, liver, pregnancy-induced liver enlargement, oxidative stress, cholesterol metabolism

Student number: 2014-20362